

Universidade Nova de Lisboa

Faculdade de Ciências e Tecnologia

Departamento de Ciência dos Materiais

**Preparação e caracterização de nanocompósitos de
nanopartículas metálicas com proteínas e suas
aplicações em biossensores**

Por

Cristina Henriques Gaspar

Dissertação apresentada na Faculdade de Ciências e
Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa para
obtenção do grau de Mestre em Engenharia
Microelectrónica e Nanotecnologias

Orientador: Professor Doutor Hugo Águas

Co-orientador: Doutor João Cortez

Lisboa

2010

Para o meu pai...

Agradecimentos

Nenhum projecto é possível sem o apoio, incentivo e colaboração de todos aqueles que nos estão mais próximos. Quero deixar o meu agradecimento a todos os que tornaram possível a realização deste projecto.

Quero deixar o meu agradecimento especial ao Prof. Doutor Hugo Águas, que me orientou com paciência e dedicação durante o tempo que durou este projecto. Quero agradecer também ao Doutor João Cortez, que sem a sua paciência, dedicação e orientação, não teria sido possível a realização deste trabalho.

Quero agradecer a todos os investigadores do Cenimat, em especial à amiga e colega Diana Gaspar, que me apoiou nas longas horas de cortar substratos e fazer deposições, na câmara limpa. Agradeço aos meus colegas de Mestrado e de laboratório, eles sabem o quanto me ajudaram a levar este projecto para a frente.

Quero agradecer ao Prof. Doutor Carlos Dias, coordenador do Mestrado, por toda a paciência e ajuda que deu a todos os alunos deste Mestrado.

Quero agradecer ao Prof. Doutor Rodrigo Martins e à Prof.^a Doutora Elvira Fortunato, por terem possibilitado o acesso ao Mestrado de Microelectrónica e Nanotecnologia e por todo o apoio dado e conhecimento transmitido, ao longo do meu percurso académico, tanto na Licenciatura como no Mestrado.

Agradeço à Inês Osório, colega do 603, pelo apoio dado nas horas de desespero com a Química e nas idas à máquina do café. Agradeço também ao Prof. Doutor Ricardo Franco por me ter integrado tão bem no laboratório e por todo o apoio dado.

Quero agradecer à Inês Gomes, também colega do 603, por me ajudar a perceber alguns conceitos de Química e quero agradecer à Mestre Leonor Soares, pela síntese e funcionalização das AuNP e ao Investigador Peter Eaton, pelos ensaios de AFM, ambos do REQUIMTE/Faculdade de Ciências da Universidade do Porto.

Agradeço aos meus amigos mais próximos.

E por último, mas não com menos importância, quero agradecer às pessoas mais importantes da minha vida, a minha família, a minha mãe e irmã, que tanta paciência tiveram comigo ao longo desta jornada. E dedico este trabalho ao meu pai, porque se não fosse por ele não estaria a acabar este Mestrado.

Lista de Abreviaturas

AFM – *Atomic Force Microscopy*

AuNP – *Gold (Au) NanoParticles*

auT – Aminoundecanotiol [$\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_{10}\text{COOH}$]

BioMEMS – *Biomedical or Biological Micro-Electro-Mechanical Systems*

BNC – BioNanoConjugado

CALNN – *Cisteína-Alanina-Leucina-Asparagina-Asparagina* (péptido)

Cyst – *Cisteamina* [$\text{C}_2\text{H}_7\text{NS}$]

FEUP – Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto

IUPAC – *International Union of Pure and Applied Chemistry*

Lbl – *Layer-by-layer*

MC – 4-Metilcatecol [$\text{C}_6\text{H}_4(\text{OH})_2$]

OCP – *Open Circuit Potential*

pI – Ponto Isoelétrico

SAM – *Self-Assembled Monolayer*

TYR – *Tirosinase*

VC – Voltametria Cíclica

Y – *Tirosina* [$\text{C}_9\text{H}_9\text{NO}_3$]

Índice

Agradecimentos	- 1 -
Lista de Abreviaturas	- 3 -
Índice	- 5 -
Índice de Figuras	- 7 -
Índice de Tabelas	- 9 -
Objectivo	- 11 -
Resumo	- 13 -
Abstract	- 15 -
1. Introdução e objectivos do trabalho	- 19 -
1.1 <i>Biossensores</i>	- 19 -
1.2 <i>Método de deposição Layer-by-layer no fabrico de biossensores</i>	- 37 -
1.3 <i>Deposição de monocamadas de bionanoconjugados AuNP-CALNN + TYR em Au</i>	- 43 -
2. Metodologia	- 47 -
2.2 <i>Técnicas de detecção da actividade enzimática</i>	- 47 -
2.3 <i>Procedimento Experimental</i>	- 55 -
3. Apresentação e discussão dos resultados	- 73 -
3.1 <i>Optimização dos parâmetros de incubação/detecção de actividade enzimática</i>	- 73 -
3.2 <i>Layer-by-layer</i>	- 79 -
3.3 <i>Bionanoconjugados</i>	- 81 -
3.4 <i>Medidas de Voltametria Cíclica</i>	- 89 -
4. Conclusões	- 97 -
5. Trabalho futuro	- 101 -
6. Referências Bibliográficas	- 105 -
7. Anexos	- 111 -
<i>Anexo 1 – Medição da actividade enzimática</i>	- 111 -
<i>Anexo 2 – Influência do pH na agregação dos bionanoconjugados em solução</i>	- 113 -
<i>Anexo 3 – Ensaio de AFM</i>	- 115 -
<i>Anexo 4 – Ensaio de VC</i>	- 117 -

Índice de Figuras

Figura 1 – Representação esquemática do funcionamento de um biossensor.	- 20 -
Figura 2 – Exemplos de diferentes tipos de biossensores no mercado, de acordo com a aplicação.	- 21 -
Figura 3 – Exemplo de um biossensor enzimático.	- 23 -
Figura 4 – Mecanismo de uma reacção electroquímica directa, num biossensor amperométrico, para a determinação de mono e/ou di-fenóis.	- 25 -
Figura 5 – Representação esquemática da enzima TYR, com os dois átomos de Cu(II), como sítios activos (a verde).	- 26 -
Figura 6 – Figura esquemática de quatro métodos de imobilização enzimáticos: (A) adsorção; (B) encapsulação; (C) ligação covalente e (D) cross-linking.	- 29 -
Figura 7 – Espectro UV-Vis de soluções coloidais de AuNP, com várias geometrias.	- 31 -
Figura 8 – Mudança na coloração de uma suspensão de AuNP em água, devido ao processo de agregação.	- 32 -
Figura 9 – Funcionalização da AuNP, com um péptido CALNN.	- 34 -
Figura 10 – Esquema da funcionalização de AuNP com o péptido CALNN e da zona de ligação à AuNP e à TYR.	- 34 -
Figura 11 – Esquemático de uma AuNP, esférica, com 15nm de diâmetro.	- 35 -
Figura 12 – Esquema da deposição de filmes automontados (Layer-by-layer), num substrato sólido.	- 37 -
Figura 13 – Fotografia do elipsómetro HORIBAJOBIN YVON UVISEL™.	- 48 -
Figura 14 – Esquema do princípio de funcionamento de um AFM.	- 49 -
Figura 15 – Esquema de um Voltamograma genérico.	- 51 -
Figura 16 – Esquema de uma célula de VC, com os respectivos eléctrodos.	- 52 -
Figura 17 – Fotografia do Potencióstato Voltalab10 PGZ100.	- 53 -
Figura 18 – Camadas Layer-by-layer.	- 57 -
Figura 19 – Esquema da deposição Layer-by-layer em cuvettes de acrílico/placas de vidro.	- 58 -
Figura 20 – Modelo de duas camadas, feito no elipsómetro HORIBA Jobin Yvon.	- 65 -
Figura 21 – Ilustração do Fitting entre o modelo (linha) e medida experimental (pontos) ilustrando o ajuste perfeito do modelo à média experimental. O erro χ^2 obtido foi de 0.06 e a espessura 30,1 Å.	- 66 -
Figura 22 – Esquema de montagem dos eléctrodos, para medidas de VC.	- 70 -
Figura 24 – Valores de absorvância para 400 e 475nm, para substrato MC0.5U e Y2.5U.	- 73 -
Figura 25 – Variação do pH e estudo da agregação das AuNP CALNN 2nM.	- 74 -
Figura 26 - Variação do pH e estudo da agregação das AuNP CALNN 2nM.	- 75 -
Figura 27 – Espectros de absorvância da actividade enzimática, para um tempo de incubação de enzima e AuNP CALNN de 30 minutos seguida da adição de Y (à esquerda) e adição imediata de Y (à direita) e em função do pH.	- 76 -
Figura 28 – Espectro de absorvância da actividade enzimática, em função do tempo de espera de enzima (TYR) + substrato (Y), sobrepostos e em função do pH.	- 77 -
Figura 29 – Espectros da plasmónica de AuNP depositadas em camadas sucessivas (alternadas com TYR) por Layer-by-layer.	- 80 -
Figura 30 – Espectro de absorvância dos bionanoconjugados (AuNP CALNN 1 + 250nM TYR em tampão fosfato pH 7).	- 82 -
Figura 31 – Estudo da agregação dos bionanoconjugados (AuNP CALNN 1nM + TYR), através do pH.	- 82 -
Figura 32 – Absorvância dos bionanoconjugados, a 400 nm, em dias diferentes.	- 82 -
Figura 33 – Voltamograma, para diferentes camadas de bionanoconjugados depositadas sobre Au, numa solução de MC (1º e 2º ciclos de varrimento, em cima e em baixo, respectivamente).	- 90 -
Figura 34 – Valores de densidade de corrente dos picos de oxidação e redução, I _{oxi} e I _{red} , respectivamente, das medidas de VC para Au, auT, Cyst, TYR, BNC, auT + BNC e cyst + BNC, em dois ciclos.	- 91 -
Figura 35 – Voltamogramas de diferentes camadas de bionanoconjugados depositadas sobre Au (1º ciclo de varrimento), numa solução de MC.	- 93 -

- Figura 36** – Voltamogramas de diferentes camadas depositadas sobre Au (1º ciclo de varrimento), numa solução de MC. - 94 -
- Figura 37** – Espectro de absorvância da actividade enzimática, na presença de MC como substrato (à esquerda) e na presença de Y como substrato (à direita). - 111 -
- Figura 38** – Estudo da agregação dos bionanoconjugados (AuNP CALNN 1nM + TYR), através do pH. - 113 -
- Figura 39** – Estudo da actividade dos bionanoconjugados (AuNP CALNN 2nM + TYR), ao longo do tempo. - 113 -
- Figura 40** – Voltamogramas de cada uma das curvas de VC, para diferentes camadas de bionanoconjugados depositadas sobre Au, numa solução de MC (1º e 2º ciclos). - 117 -

Índice de Tabelas

Tabela 1 – Diferentes aplicações de biossensores, de acordo com uma área específica.	- 21 -
Tabela 2 – Descrição dos diferentes biossensores electroquímicos baseados em AuNP.	- 30 -
Tabela 3 – Resumo das vantagens do método de deposição Layer-by-layer.	- 38 -
Tabela 4 – Factores (internos ou externos) que influenciam a deposição Layer-by-layer.	- 39 -
Tabela 5 – Condições iniciais e parâmetros de medição, dos limites de detecção da actividade enzimática, na presença de MC eY como substrato, respectivamente.	- 47 -
Tabela 6 – Reagentes e soluções utilizadas.	- 55 -
Tabela 7 – Condições de deposição por canhão de electrões.	- 59 -
Tabela 8 – Parâmetros de medição de VC.	- 69 -
Tabela 9 – Optimização dos limites de detecção da actividade enzimática, na presença de MC eY como substrato, respectivamente, em cima e em baixo.	- 74 -
Tabela 10 – Estrutura, número de camadas e valores de absorvância a 400nm dos diferentes Layer-by-layer.	- 79 -
Tabela 11 – Valores de Absorvância a 400 nm, em dias diferentes.	- 83 -
Tabela 12 – Bionanoconjugados (AuNP CALNN 2nM), sem ou com SAM de Cyst ou auT e respectivos valores de espessura e absorvância, obtidos por Elipsometria Espectroscópica e Espectroscopia UV-Vis@400nm.	- 84 -
Tabela 13 – Imagens topográficas, por AFM, de diferentes depósitos efectuados sobre uma superfície de Au.	- 86 -
Tabela 14 – Espessura média dos depósitos, determinada por Elipsometria Espectroscópica e % Superfície coberta e contagem de BNC.µm-2, determinados por AFM.	- 87 -
Tabela 15 – Valores de densidade de corrente dos picos de oxidação e redução, I _{oxi} e I _{red} , respectivamente, das medidas de VC para Au, auT, Cyst, TYR, BNC, auT + BNC e cyst + BNC, em dois ciclos.	- 91 -
Tabela 16 – Valores das diferenças de corrente dos picos de oxidação e redução, I _{oxi} e I _{red} , respectivamente, das medidas de VC para auT, Cyst, TYR e BNC.	- 92 -
Tabela 17 – Optimização dos limites de detecção da actividade enzimática, na presença de MC eY como substrato, respectivamente, em cima e em baixo.	- 111 -
Tabela 18 – Imagens topográficas, por AFM, de diferentes depósitos efectuados sobre uma superfície de Au.	- 115 -
Tabela 19 – Imagens de amplitude, por AFM, de diferentes depósitos efectuados sobre uma superfície de Au.	- 116 -

Objectivo

Este trabalho foi desenvolvido no âmbito da Tese de Dissertação de Mestrado em Engenharia Microelectrónica e Nanotecnologias, no decurso do ano lectivo 2009/2010.

O seu objectivo geral foi preparar e caracterizar nanocompósitos de nanopartículas metálicas com proteínas e suas aplicações em biossensores, recorrendo a técnicas de deposição *Layer-by-layer* e deposição de bionanoconjugados

Os objectivos específicos consistiram em preparar e caracterizar bionanoconjugados de TYR (tirosinase) e nanopartículas de Ouro (AuNP) funcionalizadas com o péptido CALNN (cisteína-alanina-leucina-asparagina-asparagina), em termos de actividade e estabilidade, por Espectroscopia UV-Vis, recorrendo ao MC (4-metil catecol) como substrato e otimizar a resposta do mesmo, em função dos seguintes parâmetros: concentração de substrato, concentração de enzima TYR, concentração de bionanoconjugados e pH.

Foram feitas análises por Elipsometria Espectroscópica e por AFM (Microscopia de Força Atómica), aos bionanoconjugados imobilizados, que permitiram estudar a espessura e morfologia das camadas de bionanoconjugados depositadas (assim como a sua distribuição espacial nas camadas) nos eléctrodos de ouro. Foram feitas medições de VC (Voltametria Cíclica), para determinar as reacções de oxidação-redução da enzima nos eléctrodos. Também foi estudada a estabilidade e a robustez dos biossensores ao longo do tempo, medindo a actividade ao longo dos dias.

Como objectivo futuro, pretende-se medir a resposta do biossensor, por inibição, numa amostra de água poluída. O objectivo é determinar a interacção do pesticida (inibidor) com a enzima, observando a diminuição da actividade da mesma, por VC.

Resumo

Este trabalho consistiu no desenvolvimento de um biossensor enzimático para determinação de fenóis.

A tirosinase (TYR (EC 1.14.18.1)), proveniente de *Agaricus bisporus*, é uma enzima que catalisa a oxidação de compostos mono e di-fenólicos para as suas correspondentes quinonas, sendo interessante o seu uso, como base de um sensor enzimático para a detecção de compostos fenólicos. Assim, desenvolveu-se um biossensor baseado na TYR e em AuNP, recorrendo a duas estratégias: o método *Layer-by-layer* (depositando camadas alternadas de enzima e AuNP) e deposição de uma camada de bionanoconjugados. Estas camadas foram comparadas com enzima apenas.

Para este efeito, foram caracterizadas AuNP esféricas funcionalizadas com o péptido CALNN, assim como os respectivos bionanoconjugados com TYR, em termos das propriedades relevantes para a construção de sensores, determinando os parâmetros óptimos para a sua utilização na construção de um biossensor.

Foram preparados por *Layer-by-layer* AuNP esféricas funcionalizadas com o péptido CALNN e TYR e foi também depositada uma monocamada de bionanoconjugados, tendo-se observado actividade enzimática em ambos os casos. Os processos foram otimizados e os depósitos de bionanoconjugados caracterizados por Elipsometria Espectroscópica e AFM. A VC foi utilizada para caracterizar os biossensores de bionanoconjugados preparados e determinar a sua viabilidade como biossensores electroquímicos de compostos fenólicos.

Abstract

The main goal of this work was the development of an enzymatic biosensor for the detection of mono- and di-phenols.

The enzyme tyrosinase (EC 1.14.18.) from Agaricus bisporus, which catalyzes the oxidation of mono- and di-phenolic compounds into their corresponding quinones, can be successfully used as the basis of an enzymatic sensor for the detection of phenolic compounds. A biosensor based on TYR and AuNPs was developed through two different strategies: the Layer-by-layer method (alternated layers of enzyme and AuNPs) and a deposit of bionanoconjugates of TYR and AuNPs.

For this purpose, AuNPs were functionalized with CALNN peptides and were characterized, as well as the respective BNCs with TYR. Their characterization was made in terms of its optimal properties for the construction of sensors, determining the work parameters for its use in the construction of a biosensor.

TYR and AuNPs biocomposites were prepared by either Layer-by-layer or a deposit of BNCs on a gold surface, with enzymatic activity being observed in both cases. The processes were optimized and the biocomposites were characterized by spectroscopic ellipsometry and AFM. CV was used to characterize the biocomposites and to determine its feasibility as electrochemical biosensors of phenolic compounds.

Capítulo 1

Introdução e Objectivos do trabalho

1. Introdução e objectivos do trabalho

1.1 Biossensores

1.1.1 Definição, princípios, tipos de biossensores

No início dos anos 60, surge o primeiro conceito de biossensor (biossensor de glucose, Clark, 1962) [1]. Desde então, o campo de investigação dos biossensores tem vindo a crescer de uma forma exponencial, sendo, nos dias de hoje, uma área fundamental de trabalho.

A IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*) define biossensor como sendo “um dispositivo que usa reacções bioquímicas específicas, mediadas por enzimas isoladas, anticorpos, tecidos, organelos ou células, por forma a detectar compostos químicos, através de sinais eléctricos, térmicos ou ópticos” [1].

O princípio de funcionamento de um biossensor baseia-se num sistema de dois componentes: um elemento de reconhecimento biológico – (bio)receptor, que permite a reacção bioquímica ou uma ligação específica de um alvo – amostra, convertendo-a num sinal quantificável – transductor.

O funcionamento de um biossensor é bastante simples. Como é possível ver na Figura 1, coloca-se a amostra a analisar em contacto com o sensor, sendo possível captar apenas o substrato para o qual está desenhado o receptor biológico. Quando tem lugar a reacção de reconhecimento biológico, esta é detectada pelo transductor, que produz um sinal quantificável, directamente proporcional à concentração de substrato específico [3].

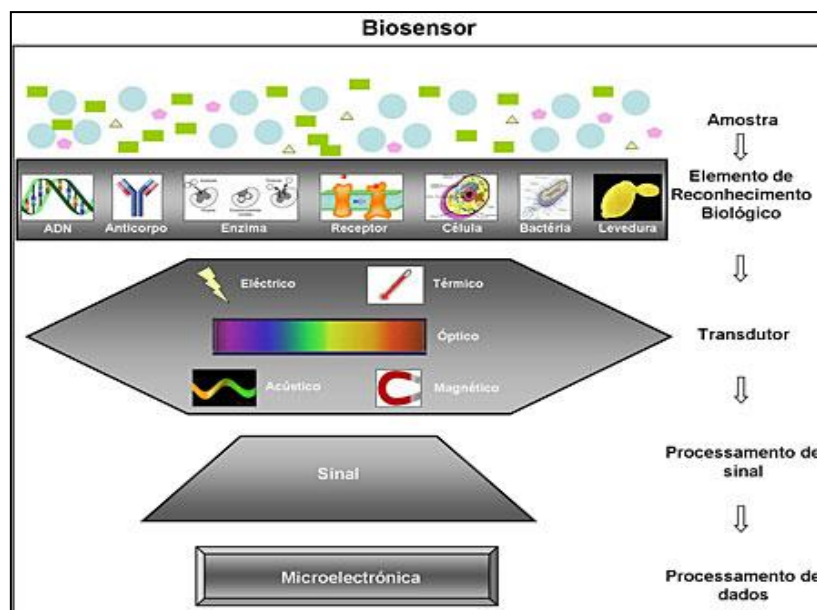


Figura 1 – Representação esquemática do funcionamento de um biossensor [2].

No entanto, não basta um biossensor apresentar um princípio de funcionamento simples. É necessário que a fiabilidade do mesmo seja elevada e esta depende de vários factores, tais como a afinidade e especificidade elevadas e de uma boa estabilidade quando em operação, uma retenção da actividade biológica no estado de imobilização e não ter contaminação indesejada na amostra.

A situação actual dos biossensores existentes no mercado é muito variada, existindo diferentes biossensores [4], de acordo com a finalidade pretendida (ver Figura 2). Existem biossensores compactos, portáteis ou de bancada, que respondem em tempo real ou num curto espaço de tempo. Existem biossensores que requerem uma manipulação mínima da amostra, de fácil manuseamento, caros, baratos, selectivos ou de elevada especificidade. Existem biossensores sensíveis, lineares, reproductíveis, com limites de detecção e quantificação alargados, robustos, estáveis e com capacidade de miniaturização.



Figura 2 – Exemplos de diferentes tipos de biossensores no mercado, de acordo com a aplicação [4].

Os biossensores apresentam presentemente diversas possibilidades de aplicação, especificadas na Tabela 1.

Tabela 1 – Diferentes aplicações de biossensores, de acordo com uma área específica [4].

Área	Aplicação
Médica	Monitorização das condições de pacientes portadores de problemas crónicos
Biomédica	Diagnósticos rápidos e precisos, em tempo real
Alimentícia	Deteção de contaminantes químicos, biológicos e toxicológicos
Farmacêutica	Screening de fármacos, análise de insumos farmacêuticos e produtos acabados, monitorização <i>in vivo</i> da acção de fármacos e toxinas
Ambiental	Monitorização da contaminação de águas, resíduos industriais e emissão de gases poluentes
Biotecnológica	Optimização do bioprocesso para obtenção de biocombustível
Militar	Deteção de toxinas e patógenos no combate ao bioterrorismo
Agricultura	Deteção e quantificação de patógenos bacterianos e virais, definindo posições com auxílio de sistema de posicionamento global (GPS). Deteção de pesticidas em alimentos e no solo
Pecuária	Deteção de fármacos residuais em animais destinados ao consumo como alimentos

Mais recentemente, foi desenvolvida uma classe de biossensores, os BioMEMS, que são dispositivos construídos à micro/nanoescala, usados para processar, libertar, manipular ou analisar entidades químicas e biológicas [4].

Podemos agora falar numa multidisciplinidade de áreas de investigação, a nível dos biossensores, onde se incluem algumas “novas” áreas, que surgiram dessa mesma necessidade de investigação em biossensores, em ligação com as áreas existentes de investigação, tais como a Bioinformática, a Engenharia de Materiais, a Bioquímica, a Medicina, a Química, a Física e a Bioelectrónica.

Uma estratégia a usar nestas áreas de investigação é a procura de novos materiais, diferentes mediadores e novas técnicas de imobilização. Têm também sido levados a cabo inúmeros estudos para melhorar biossensores já existentes, assim como avanços tecnológicos significativos na procura de novas formas de análise *in-situ*, como por exemplo, na imobilização de depósitos de bionanoconjugados, numa superfície de AuNP (nanopartículas de Ouro), tema desta Tese de Mestrado.

Desta forma, os biossensores assumem, cada vez mais, grande importância na nossa sociedade, o que tem vindo a promover a investigação neste campo.

No caso dos biossensores ambientais, esta investigação passa pelo desenvolvimento de mecanismos rápidos e eficientes de controlo ambiental (monitorização/detecção e quantificação) e é devida ao aumento de produção e utilização desses produtos químicos, em particular, de poluentes químicos com compostos fenólicos na sua constituição, sem qualquer tipo de consciência ambiental, aumentando, desta forma, a poluição ambiental [5].

Há, portanto, a necessidade de recorrer a novas metodologias, para identificar, quantificar e tratar os diferentes poluentes, com especificidade, fiabilidade e rapidez, preferencialmente,

fazendo as análises *in-situ*. Todas estas características necessárias à resolução deste problema, encontram-se nos biossensores [5].

No entanto, tal como tudo o que nos rodeia, um biossensor apresenta vantagens e desvantagens [6]. Uma das vantagens dos biossensores é que estes apresentam um tempo de resposta curto e, como tal, uma medição em tempo-real. A natureza dos próprios biossensores permite uma miniaturização e uma consequente integração em sistemas de medição portáteis, fazendo dos biossensores a escolha perfeita para medições *in-situ*. Dadas estas características, os biossensores podem, por vezes, ser produzidos em massa, reduzindo em muito o seu custo de produção/venda. Mas, por outro lado, o elemento biológico pode apresentar fraca estabilidade em condições adversas ou sub-óptimas, o que pode ser uma razão para a lenta comercialização de alguns biossensores.

1.1.2 Biossensores Enzimáticos

Um biossensor enzimático é um dispositivo que apresenta um elemento biológico de reconhecimento (enzima ou enzimas), em contacto com um transductor electroquímico (ver Figura 3).

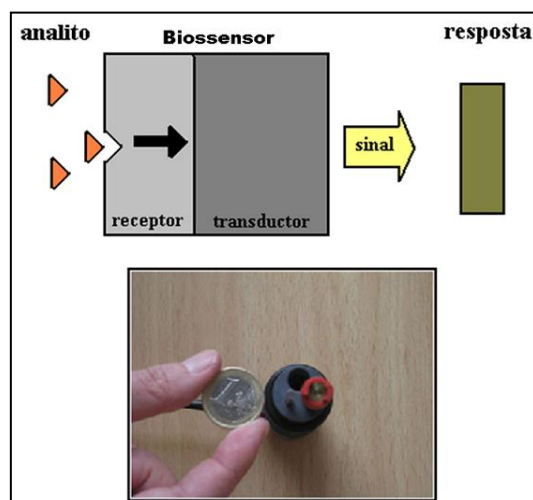


Figura 3 – Exemplo de um biossensor enzimático (adaptado de [7]).

A(s) enzima(s) detecta(m) selectivamente a substância a analisar (analito) e produzem uma resposta bioquímica que o transductor converte num sinal, usualmente eléctrico, mensurável.

Este sinal é registado, recorrendo a *Software* específico, sendo possível monitorizar a concentração do analito correspondente, de um modo fiável.

Uma enzima é um catalisador biológico, com elevada eficiência e especificidade, o que torna o seu uso, num biossensor, de grande utilidade. A maioria das reacções enzimáticas ocorrem num período muito curto de tempo, à temperatura ambiente, sem necessidade de valores extremos de pressão ou temperatura. [8].

Os biossensores enzimáticos são específicos para um determinado elemento biológico [9], ou seja, o elemento biológico apresenta especificidade para uma determinada classe de compostos, como no caso dos compostos fenólicos (ver Capítulo 1.1.3).



A actividade específica da enzima, sobre um determinado composto (substrato) ou uma determinada classe de compostos, em geral, é responsável pelos inúmeros biossensores enzimáticos propostos na literatura para a determinação de uma grande diversidade de compostos em matrizes diversas. Por exemplo, a enzima TYR (tirosinase) tem sido largamente explorada na preparação de biossensores electroquímicos, visando a utilização destes na determinação de compostos fenólicos (substratos de TYR), em amostras biológicas, alimentos e amostras ambientais [10], tal como é explicado no Capítulo 1.1.4.

Relativamente ao processo de imobilização da enzima na superfície, o mais utilizado tem sido o de imobilização por ligação covalente, onde a imobilização é feita por ligações entre os grupos funcionais da enzima à superfície. No entanto, esta técnica apresenta uma desvantagem, a perda de parte da actividade enzimática, devido às alterações nas conformações dos sítios activos da enzima [11], podendo influenciar/modificar a resposta do biossensor.

1.1.3 Biossensores para detecção de compostos fenólicos

Dentro de uma vasta gama de poluentes, encontram-se, bastante frequentemente no meio ambiente, compostos fenólicos e derivados, conhecidos devido à sua elevada toxicidade. Estes compostos encontram-se frequentemente em efluentes industriais, provenientes da produção de tintas, corantes, plásticos, entre outros compostos nocivos e/ou perigosos. No entanto, os compostos fenólicos estão também presentes na natureza, principalmente em plantas [12], sendo responsáveis por diversas propriedades, como, por exemplo, a cor dos frutos ou flores. Desta forma, é possível relacionar a qualidade dos alimentos com a presença de fenóis, principalmente em bebidas alcóolicas ou sumos [5].

É possível determinar a presença de fenóis numa amostra amperometricamente, através de uma oxidação electroquímica directa [13]. Os biossensores amperométricos operam com um baixo potencial aplicado a um eléctrodo de referência, onde se mede a corrente gerada pela reacção biocatalisada de oxidação ou redução das espécies electroactivas na superfície do eléctrodo [5], como esquematizado para o caso da TYR na Figura 4. Na figura está representada a equação que rege o funcionamento do biossensor utilizado neste trabalho. Foi usado o mono-fenol 4-metil catecol. As equações electroquímicas associadas do mono-fenol

, com libertação de oxigénio e *o*-quinona  e também com troca de dois electrões.

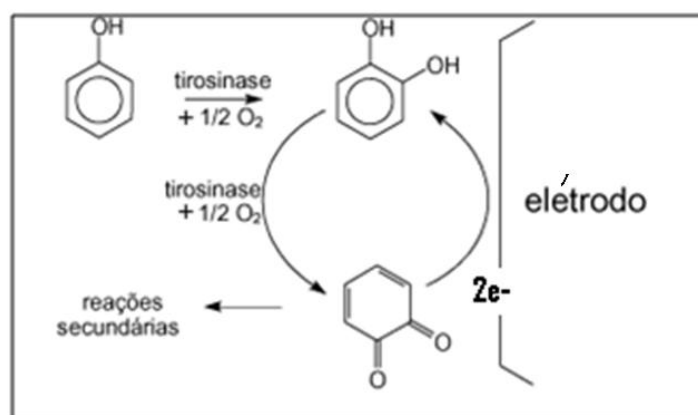


Figura 4 – Mecanismo de uma reacção electroquímica directa, num biossensor amperométrico, para a determinação de mono e/ou di-fenóis [14].

A enzima TYR é usada na preparação de biossensores electroquímicos, por forma a detectar a presença de compostos fenólicos (substratos de TYR), em amostras biológicas, ambientais ou até mesmo em alimentos [10].

A detecção pode ser feita por inibição, onde a quantidade de substância inibidora (pesticida) a detectar é proporcional à diminuição da quantidade de *o*-quinona produzida na reacção enzimática (ver Capítulo 1.1.4., reacção (2)), já que vai inibir a actividade da enzima. Há uma diminuição da taxa da corrente de redução devido à *o*-quinona produzida, para quantificar a substância inibidora [9].

1.1.4 TYR, funções, características, actividade e sua detecção, aplicação em biossensores

A enzima TYR obtida a partir do cogumelo *A. bisporus*, é a utilizada na maioria dos estudos com biossensores amperométricos. Esta enzima existe em múltiplas formas, distribuídas diferencialmente em várias partes do cogumelo [14]. Essas formas podem apresentar diferentes características, como, por exemplo, diferentes valores de actividade.

A TYR (EC 1.14.18.1) é uma enzima monoxigenase, também conhecida como polifenol oxidase, que, na sua forma oxigenada, contém dois átomos de Cu(II), como sítios activos [15], como se pode ver na Figura 5, sendo produzida por fungos, leveduras, mamíferos, plantas (maçãs, batatas), entre outros [16].

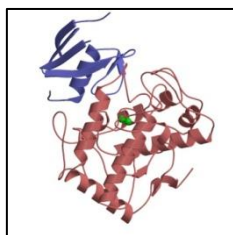
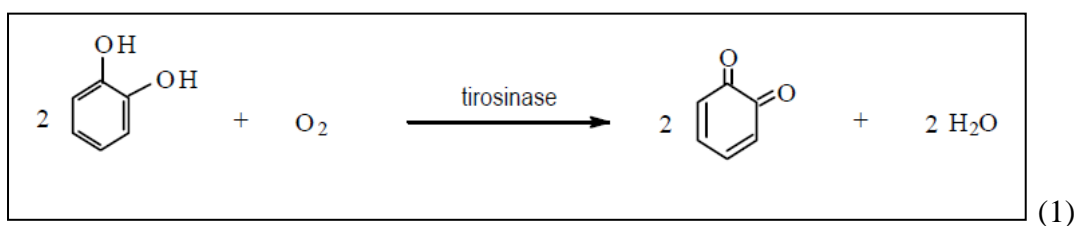


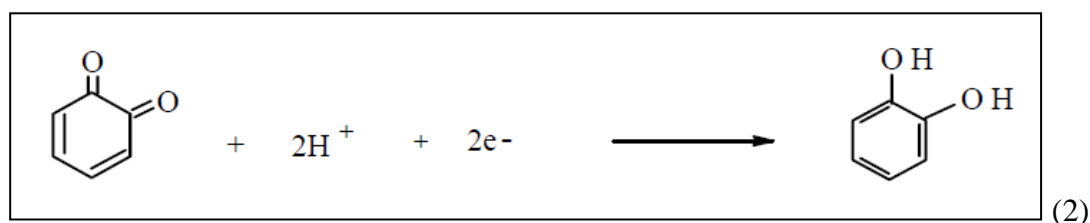
Figura 5 – Representação esquemática da enzima TYR, com os dois átomos de Cu(II), como sítios activos (a verde) [17].

A TYR está envolvida na biosíntese da melanina, que é a responsável pela pigmentação dos animais, por exemplo e pelo escurecimento dos alimentos, apresentando uma cor acastanhada escura.

A TYR é uma oxireductase, que cataliza reacções redox. A reacção de oxidação de MC (4-metil catecol), catalisada pela enzima TYR, está representada na Equação (1), de uma forma simplificada [9]:



A determinação da *o*-quinona produzida, que é reduzida electroquimicamente no eléctrodo ao respectivo composto fenólico, é feita segundo a Equação (2):



Uma das característica da enzima é o pI (ponto isoeléctrico) é o valor de pH ao qual uma molécula apresenta carga eléctrica global igual a zero, ou seja, existe um equilíbrio entre as cargas negativas e positivas presentes na enzima.

Alterando o pH, é possível tornar a molécula mais positiva ou mais negativa. No entanto, é necessário ter em conta que valores extremos de pH, podem alterar ou até mesmo, suprimir a actividade da molécula.

O pI da TYR é cerca de 4.75 [18], de acordo com as condições de temperatura ou pressão, em que a TYR apresenta carga global neutra.

Neste trabalho, o pH utilizado experimentalmente foi o pH ótimo da TYR, entre 6 e 7, pelo que a enzima apresentará uma carga global ligeiramente negativa em solução. No caso da conjugação da TYR com as AuNP para formar bionanoconjugados, a ligação terá lugar preferencialmente através de zonas de carácter positivo que a proteína conserva entre pH 6 e 7, formando os bionanoconjugados desejados.

Algumas das vantagens no uso de biossensores amperométricos à base de tirosina são: baixo custo, elevada selectividade e sensibilidade, podendo ser descartáveis quando contaminados, eliminando dessa forma, os mecanismos de reactivação da enzima, após o procedimento de análise [9].

No entanto, existem inconvenientes, visto que se tratam de biossensores enzimáticos, a enzima pode sofrer perda de actividade [11]. Essa perda de actividade pode estar associada a diversos factores, como por exemplo, ao pH, à temperatura ou a compostos que inibam a actividade da enzima específica utilizada.

Relativamente aos processos de construção, os biossensores electroquímicos à base de TYR, podem ser preparados imobilizando a TYR directamente no eléctrodo. Existem descritos na literatura vários métodos de imobilização da enzima, como, por exemplo, a imobilização na superfície de carbono vítreo, através de *cross-linking* [19] (ver Figura 6).

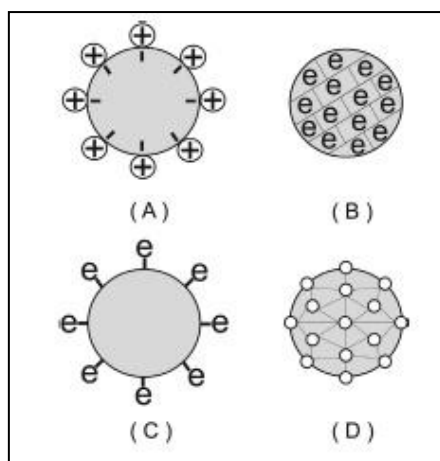


Figura 6 – Figura esquemática de quatros métodos de imobilização enzimáticos: (A) adsorção; (B) encapsulação; (C) ligação covalente e (D) *cross-linking* [19].

Existem também diversos biossensores electroquímicos descritos na literatura, baseados em AuNP [20], como se pode ver na Tabela 2.

Tabela 2 – Descrição dos diferentes biossensores electroquímicos baseados em AuNP [20].**Biossensores electroquímicos**

Baseados em materiais híbridos com nanotubos de carbono	▪ Eléctrodo modificado/revestido com nanotubos de carbono e AuNP electrodepositadas, onde a enzima vai ser imobilizada por <i>cross-link</i>
Baseados em materiais híbridos com polímeros	▪ Compósitos de AuNP e moléculas são sintetizados e depositados na superfície de um eléctrodo de carbono-vítreo, por polimerização, seguida da imobilização da enzima
Baseados em matriz sol-gel	▪ AuNP são incorporadas em sol-gel ou depositadas na superfície, aumentando a conductividade da estrutura obtida e promovendo a imobilização da enzima

Imunosensores electroquímicos enzimáticos baseados em AuNP

Biossensores electroquímicos enzimáticos de ADN baseados em AuNP

Outros biossensores baseados em AuNP

No caso desta Tese de Mestrado, os biossensores são biossensores enzimáticos baseados em deposição de Au sobre uma superfície, por canhão de electrões, de forma a melhorar a imobilização dos bionanoconjugados.

1.1.5 Aplicações de AuNP em biossensores

Um importante ramo da Nanotecnologia é a Nanobiotecnologia, que inclui o uso de nanoestruturas para aplicações altamente sofisticadas, máquinas ou materiais em biologia e/ou medicina e também o uso de moléculas biológicas para produzir estruturas à nanoescala [21].

O reconhecimento molecular é apenas uma das capacidades das muitas moléculas biológicas existentes. Algumas moléculas biológicas são capazes de reconhecerem e se ligarem a outras moléculas, com uma selectividade e especificidade elevadas, como foi descrito no Capítulo 1.1.1.

As nanopartículas, tal como o prefixo indica, são partículas com apenas alguns nanómetros de diâmetro. Estas, à nanoescala, apresentam propriedades bastantes diferentes quando comparadas com o material à macroescala. As AuNP podem apresentar diferentes geometrias e tamanhos.

Na Figura 7, encontra-se um gráfico referente às plasmónicas de AuNP, com diferentes geometrias e a plasmónica de absorção de cada uma delas.

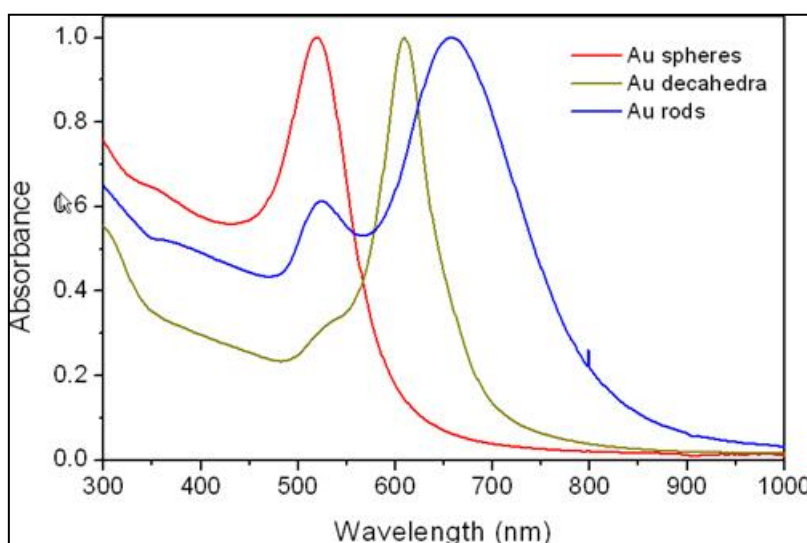


Figura 7 – Espectro UV-Vis de soluções coloidais de AuNP, com várias geometrias [22].

Soluções coloidais de AuNP com diâmetros entre 5-30nm, apresentam uma coloração vermelha, ao passo de que com tamanhos maiores ou pela sua agregação, as mesmas AuNP passam a exibir uma coloração azul, como se pode ver na Figura 8.

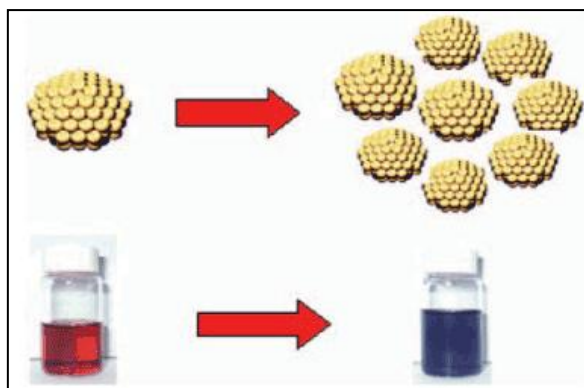


Figura 8 – Mudança na coloração de uma suspensão de AuNP em água, devido ao processo de agregação [23].

Um importante factor a ter em conta é a possível agregação das AuNP, na medida em que as AuNP ao agregarem, além de exibirem uma cor diferente, vão apresentar características diferentes (como diferente área superficial), podendo influenciar o desempenho do biossensor.

A agregação de AuNP esféricas (com cerca de 5-30nm) é tipicamente acompanhada de mudança de cor de vermelho para azul (ver Figura 8), e este fenómeno tem sido explorado para o desenvolvimento de biossensores ópticos, com base em métodos de análise colorimétrica. Estes dispositivos são capazes de detectar quantidades vestigiais de um determinado elemento biológico.

Falando especificamente das AuNP, encontram-se descritas na literatura diversas formas de sintetizar AuNP e de controlar a sua síntese de modo a obter a forma e o tamanho pretendidos. O caso do Au é especial, na medida em que se liga com bastante facilidade a grupos tióis, permitindo dessa forma a funcionalização das AuNP e o desenvolvimento de sistemas metalorgânicos de grande complexidade [23].

A funcionalização é também um factor importante, na medida em que as AuNP ao serem funcionalizadas (revestidas) poderão tornar-se mais estáveis, modificando (ou até evitando) a agregação, quando em solução coloidal. No caso específico da funcionalização das AuNP-CALNN, a solução coloidal, em condições adequadas de armazenamento (ambiente escuro e

à temperatura ambiente), mantêm-se cerca de 1 mês sem a criação de fungos ou sem agregarem.

Algumas características das AuNP, tais como energia superficial elevada, rácio superfície/volume elevado, particularidade de diminuir a distância entre partículas de metal e proteínas ou serem altamente condutoras, fazem com que a troca directa de electrões entre proteínas e eléctrodos seja facilitada [20]. Isto é, as AuNP permitem a troca directa de electrões entre o sítio activo de enzimas e eléctrodos, sem necessidade da presença de mediadores de troca de electrões [20].

Uma das maiores vantagens das AuNP é a de permitirem uma imobilização estável das biomoléculas, retendo/fixando a sua bioactividade. Essa imobilização vai determinar o tipo de biossensor, por exemplo, um biossensor enzimático, é um biossensor baseado na imobilização da enzima [9], um imunossensor [24] envolve a imobilização de anticorpos e existem ainda biossensores de ADN , onde é imobilizado material genético [25].

As AuNP podem ser funcionalizadas com diferentes ligandos, normalmente tiolados num extremo, fazendo uso da grande afinidade entre o Au e os grupos tiol. Entre os possíveis ligandos, péptidos podem ser utilizados de modo a conferir às AuNP um ambiente mais compatível e favorável à ligação com proteínas e à manutenção da actividade de biomoléculas (ver Figura 9).

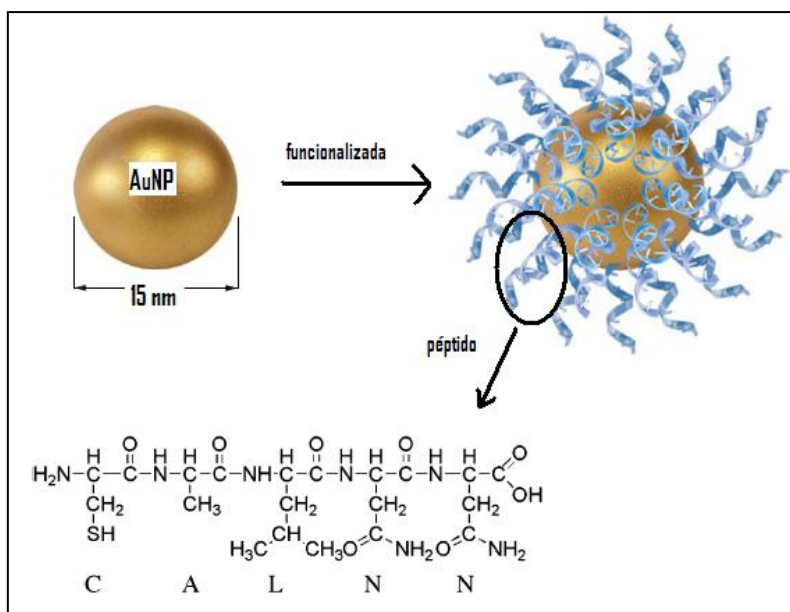


Figura 9 – Funcionalização da AuNP, com um peptídeo CALNN (adaptado de [28] e de [29]).

A funcionalização da AuNP permite tornar as AuNP mais biocompatíveis, uma vez que cria uma superfície (com características próximas de uma proteína) que terá interações electrostáticas, pontes de hidrogénio ou interações fracas com a TYR, que não irão causar distorções significativas na estrutura da proteína. Como pode ser visto na Figura 10, a AuNP foi funcionalizada com o peptídeo CALNN, porque este apresenta um tiol (cisteína) com uma grande afinidade para o Au de um dos extremos (terminus C) e do outro extremo (terminus N), apresenta um grupo carboxilo e amida que irão interagir com a TYR, promovendo a imobilização do composto AuNP-CALNN à superfície de vidro do biossensor, por outro lado e promovendo também a imobilização da TYR, sem afectar a actividade da mesma, por outro.

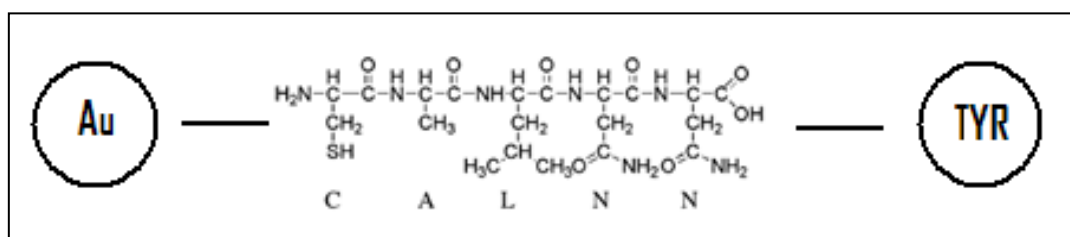


Figura 10 – Esquema da funcionalização de AuNP com o peptídeo CALNN e da zona de ligação à AuNP e à TYR.

Para esta Tese de Mestrado, as AuNP utilizadas foram sintetizadas por redução química de um sal de Au (III) a Au metálico (0), na presença de um agente de revestimento com forte afinidade para o Au, como o citrato de sódio, segundo o método de Turkevich [26]. As AuNP assim sintetizadas foram funcionalizadas com o péptido –CALNN- (cisteína-alanina-leucina-asparagina-asparagina) [27], na Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, pela Mestre Leonor Soares.

As AuNP usadas nesta Tese de Mestrado apresentavam um diâmetro médio de 15nm, esféricas, tendo uma plasmónica de absorção da ordem dos 525nm (ver Figura 11).

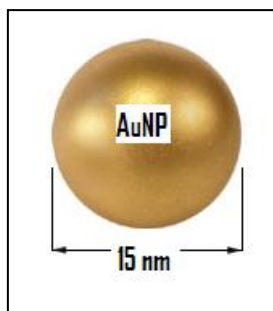


Figura 11 – Esquemático de uma AuNP, esférica, com 15nm de diâmetro (adaptado de [28]).

Em resumo, as propriedades únicas das AuNP promovem um ambiente adequado para a imobilização das biomoléculas, fixando a sua actividade biológica e facilitando a troca de electrões entre as proteínas imobilizadas e a superfície de eléctrodos, tornando-as importantes no uso em biossensores [20].

1.1.6 Pontos de inovação em biossensores

Cada vez mais há a necessidade de detectar substâncias em tempo real e de monitorizar e preservar os compostos presentes em alimentos ou em materiais biológicos. Justifica-se, assim, o grande interesse no desenvolvimento de biossensores em áreas tão distintas, como sendo a área ambiental e a área clínica, por exemplo [5].

No entanto, é necessário ter em conta um conjunto de parâmetros de operação, no momento da identificação e da monitorização de compostos fenólicos. É necessário que os biossensores não sejam sujeitos a condições extremas de temperatura ou de pH, por forma a preservar o elemento biológico activo. Além disso, é necessário fazer uma optimização desses parâmetros (pH, temperatura, concentração), de modo a que haja uma maximização da resposta do biossensor e uma elevada estabilidade. Devido a estas condicionantes, o uso de biossensores para detecção e monitorização de compostos fenólicos e derivados *in-situ*, está ainda longe de ter atingido todo o seu potencial [5].

Nesta Tese de Mestrado tentou-se desenvolver uma nova técnica para a produção de um sensor enzimático pela criação de bionanoconjugados de TYR e AuNP CALNN em solução, seguida da sua imobilização num eléctrodo de Au. Estes bionanoconjugados foram depositados directamente na superfície de Au ou após deposição de SAM (camada automontada), com o intuito de imobilizar os bionanoconjugados sem a formação de ligações covalentes (as quais levam a perdas significativas de actividade enzimática).

1.2 Método de deposição *Layer-by-layer* no fabrico de biossensores

1.2.1 Princípio *Layer-by-layer*, com AuNP e proteínas, possíveis vantagens

O método *Layer-by-layer* baseia-se na deposição de camadas alternadas de moléculas de carga oposta, por atracção electrostática [30].

O objectivo do uso do método *Layer-by-layer* para a construção de biossensores é o de proporcionar robustez, durabilidade e eficiência aos mesmos pela imobilização da TYR e AuNP, apenas por ligações electrostáticas. As vantagens desta técnica são a sua simplicidade, baixo custo operacional e fácil manipulação.

A Figura 12 ilustra esquematicamente o processo de fabrico de um filme automontado, através da interacção electrostática entre camadas de carga oposta e a estrutura ideal de um filme automontado em bicamada, respectivamente. Um suporte sólido serve como base, para que o biocompósito seja adsorvido pela superfície carregada negativamente. Algumas superfícies, tais como metais, silício ou vidro, apresentam cargas superficiais negativas quando mergulhados em solução [30].

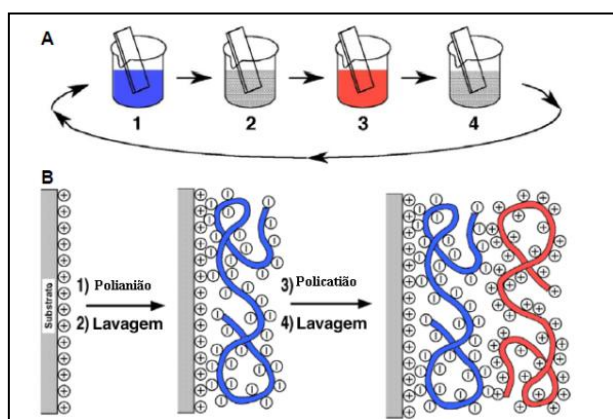


Figura 12 – Esquema da deposição de filmes automontados (*Layer-by-layer*), num substrato sólido. As etapas 1 e 2 representam a adsorção das camadas na superfície do substrato, respectivamente, camada 1 e 2, formando camadas automontadas sucessivas. As etapas 2 e 4 são referentes a processos intermédios de lavagem. No final da etapa 4, apresenta-se um filme automontado de bicamada (adaptado de [30]).

No exemplo da Figura 12, o substrato sólido está inicialmente carregado positivamente e após a adsorção da camada 1, a rede de cargas da superfície torna-se negativa (etapa 2). Seguidamente, o substrato é imerso numa solução que contém a biomolécula carregada negativamente e que gera uma camada superficial de cargas negativa. Obtém-se, desta forma, uma bicamada sobre um substrato (etapa 3). Este processo pode ser repetido tantas vezes quanto o número de camadas pretendido, obtendo multicamadas com estruturas e espessuras desejadas.

Este efeito de interacção electrostática, assume grande importância para a imobilização de TYR numa superfície. Também é importante que os filmes automontados sejam feitos com substâncias solúveis em água, na sua maioria, o que favorece o uso e estabilidade de biomoléculas. A desnaturação da biomolécula é minimizada devido à adsorção, que pode ser feita em condições adequadas de pH e temperatura [30].

A Tabela 3 apresenta um resumo das vantagens do método de deposição *Layer-by-layer*.

Tabela 3 – Resumo das vantagens do método de deposição *Layer-by-layer*.

Vantagens
▲ Este método utiliza moléculas solúveis em água, o que faz com que haja uma maior quantidade de moléculas adsorvidas pelo substrato.
▲ Como se processa à escala nanométrica, há um controlo maior de montagem das AuNP CALNN.
▲ Esta técnica de automontagem, devido à sua simplicidade, versatilidade e robustez, leva a que seja possível o emprego de biomoléculas diferentes, para aplicações diferentes.

1.2.2 Factores que influenciam a deposição *Layer-by-layer* e a actividade de enzimas em camadas *Layer-by-layer*, pH, tipo de AuNP, carga enz/AuNP

A imobilização de enzimas em filmes automontados, na sua maioria, tem como finalidade a construção de biossensores.

Existem diversos factores que influenciam a deposição *Layer-by-layer* (externos ou internos) detalhados na Tabela 4. Esta influência é determinante na medida da actividade das *Layer-by-layer*.

Tabela 4 – Factores (internos ou externos) que influenciam a deposição *Layer-by-layer*.

▪ Factores internos	▪ Factores externos
<ul style="list-style-type: none"> ○ pH ○ pI da enzima ○ tipo (forma, tamanho, estado de agregação) da AuNP ○ carga enzima/AuNP ○ Concentração da enzima 	<ul style="list-style-type: none"> ○ Mudança de fornecedor de enzima (pode influenciar a actividade da mesma) ○ Factores ambientais

Dentro dos factores internos, parâmetros como o pH, tipo de AuNP e carga enzima/AuNP são de extrema importância e estão intimamente correlacionados, na medida em que influenciam directamente a imobilização dos bionanoconjugados e a actividade da enzima utilizada.

O pH da solução vai influenciar em grande parte a taxa de sucesso de imobilização da TYR num biossensor. A superfície da AuNP encontra-se carregada negativamente e é necessário que a TYR tenha uma carga envolvente neutra ou preferencialmente positiva. O pH da solução tem uma grande influência na carga global da enzima. A enzima possui um ponto isoeléctrico (pI) característico, assumindo uma carga global positiva ou negativa de acordo com o pH do meio. Deste modo, para valores de pH abaixo do pI da enzima, esta assumirá uma carga global positiva e para valores de pH acima do pI uma carga global negativa. Isto é, o pH do meio de imobilização modifica as interações entre os grupos de cargas eléctricas ou dipolos, da enzima e do suporte, o biossensor, influenciando directamente a afinidade entre eles. A situação ideal é encontrar um compromisso entre a carga da enzima e carga superficial do substrato para imobilização por controlo do pH do meio. As AuNP CALNN possuem uma carga superficial global negativa a pH 7. A carga global da TYR é também globalmente negativa a pH 7, mas a proteína possui zonas de aminoácidos com carga positiva, os quais interagem electrostaticamente com as AuNP CALNN.

No presente caso, sobre a superfície de Au do eléctrodo depositou-se uma camada inicial de TYR (ligada através de resíduos superficiais positivos), sobre a qual se depositou uma camada de AuNP CALNN (que interage com os resíduos positivos da TYR depositada previamente). A camada subsequente de enzima irá interagir electrostaticamente com as AuNP e assim sucessivamente.

Além disso, se o pH da solução for demasiado alto (básico) ou baixo (ácido), podem ocorrer duas situações distintas: a desnaturação da proteína (neste caso, a desnaturação do péptido CALNN ou da TYR) ou a agregação das AuNP, observável pela mudança de cor de vermelho para azul. No caso de ocorrência de agregação (ver Capítulo 1.3.2), esta não influencia as medidas de actividade ou até mesmo a imobilização no biossensor.

A concentração da enzima na preparação de bionanoconjugados ou do sensor para *Layer-by-layer* é também um parâmetro importante a ter em conta, uma vez que uma pequena concentração de enzima na solução pode levar a um aumento de intensidade das forças de interacção entre enzima/AuNP. Baixa concentração de enzima pode levar a problemas de deposição, sendo mais difícil a imobilização e a agregação, visto que há interacção entre as AuNP e um excesso de enzima é desperdício [31].

Não esquecer também que qualquer alteração ambiental, como aumento/diminuição significativo de temperatura, irá afectar o elemento biológico do biossensor, podendo inutilizá-lo.

1.2.3 Caracterização das *Layer-by-layer*, actividade, espessura das camadas, quantidade de AuNP

A caracterização das *Layer-by-layer* foi feita com base em diversas medidas de actividade, por monitorização da formação de produtos da reacção na gama dos 325 aos 700nm.

O objectivo desta caracterização consistiu na medição da actividade enzimática das camadas, por forma a determinar o número de camadas óptimas a utilizar. Para tal, efectuaram-se medidas de actividade por Espectroscopia UV/Vis em que se monitorizou a actividade da enzima, de acordo com o número de camadas presentes no biossensor.

A concentração de AuNP também influencia a medida de actividade das camadas, na medida em que maiores concentrações de AuNP permitem um maior número de possíveis ligações à enzima e, consequentemente, levam a um aumento da quantidade de TYR depositada e da actividade presente nos depósitos formados.

Esta medida da actividade da enzima será maior ou menor consoante o maior ou menor número de camadas, respectivamente, sendo expectável, a partir de um certo número de camadas, esse aumento de actividade deixará de ser significativo. A plasmónica das AuNP sofre um ligeiro desvio para comprimentos de onda superiores, revelando interações entre as várias camadas de AuNP depositadas. A medida da actividade enzimática varia consoante o número de camadas presente. A cada nova camada de *Layer-by-layer*, regista-se um aumento de actividade e, por vezes, começa a haver um desvio da plasmónica, indicando agregação das AuNP, onde o aumento de valor de actividade deixa de ser significativo e deixa de ser necessária a sobreposição de mais camadas.

É deste modo necessário encontrar um compromisso entre o número de camadas, a concentração da solução coloidal de AuNP e a actividade máxima das camadas a depositar no eléctrodo.

1.3 Deposição de monocamadas de bionanoconjugados AuNP-CALNN + TYR em Au

1.3.1 Bionanoconjugados de TYR e AuNP CALNN , preparação, características, actividade, detecção óptica, electroquímica

Um bionanoconjugado, tal como o nome indica, é um conjugado com uma parte orgânica – bio (TYR) – e uma parte inorgânica – AuNP – de dimensões reduzidas, formando um complexo que é chamado de BioNanoConjugado ou BNC, que possui uma actividade biológica pretendida.

A preparação dos bionanoconjugados assume um papel importante, na medida em que é necessário garantir a imobilização dos mesmos, sem alterar a actividade enzimática. Estes bionanoconjugados são normalmente formados em solução aquosa com AuNP, funcionalizados ou não com uma proteína, péptido ou outras biomoléculas. Uma das vantagens da utilização de AuNP como suporte para biomoléculas é a sua elevada área superficial e como tal a sua capacidade de servir como suporte para imobilizar elevadas quantidades de biomoléculas por nanopartícula. A quantidade de enzima imobilizada nas AuNP, por exemplo, depende da enzima específica a ser utilizada e como tal controlará a bioactividade dos BNC produzidos. Estudos prévios [52] indicam que a utilização de razões entre concentrações de AuNP e TYR de 1:50 a 1:100 produzem bionanoconjugados de elevada actividade e estabilidade. Deste modo, os bionanoconjugados utilizados neste trabalho foram produzidos tendo em conta as condições citadas.

1.3.2 Factores que influenciam a deposição de bionanoconjugados e a sua actividade

Existem vários factores que influenciam a deposição de bionanoconjugados e condicionam a actividade da enzima, influenciando directamente o desempenho do biossensor. Estes factores estão igualmente presentes na deposição das *Layer-by-layer* (ver Tabela 4, Capítulo 1.2.2.).

Todas as condições extremas que poderão danificar material biológico, vão influenciar a deposição e a actividade dos bionanoconjugados. Temperaturas demasiado elevadas ou demasiado baixas, vão influenciar a actividade enzimática, por perda de actividade por parte da enzima e vai ser difícil ou mesmo impossível, a detecção, quer óptica quer eléctrica, de actividade no biossensor.

Capítulo 2

Metodologia

2. Metodologia

2.2 Técnicas de detecção da actividade enzimática

2.2.1 Colorimetria (Espectroscopia UV-Vis)

A espectroscopia de absorção no visível permite medidas de absorvância, reflectância e transmitância, tanto na região do visível, como do UV ou do IV-próximo [32]. Essas medidas permitem determinar diferentes propriedades de uma amostra em solução e, neste caso, foram efectuadas medidas de absorvância no visível, por forma a determinar a actividade da TYR apenas e quando conjugada com as AuNP CALNN. Esta técnica foi também usada para determinar a actividade enzimática dos eléctrodos montados. Por deposição em placas de vidro transparentes foi possível determinar a variação da plasmónica de AuNP depositadas por *Layer-by-layer*, permitindo monitorizar a sua agregação. Foi usado o espectrofotómetro UNICAM UV/VIS Spectrometer UV2 e o espectrofotómetro THERMO Electron Corporation HELIOS γ .

Tabela 5 – Condições iniciais e parâmetros de medição, dos limites de detecção da actividade enzimática, na presença de MC e Y como substrato, respectivamente.

Parâmetros de medição	
Absorvância	325 – 700nm
[TYR]	5 – 100U/ml
[MC]	0.1 – 25mM
[Y]	0.1 – 1mM
Tampão fosfato pH 7	10mM

2.2.2 Elipsometria Espectroscópica

A Elipsometria Espectroscópica é uma técnica óptica, não destrutiva, com bastante potencial e relativamente fácil de utilizar, que visa determinar as propriedades de um material. Trata-se

de uma aplicação muito importante para a caracterização de filmes finos, medindo a espessura das amostras, onde a caracterização dos materiais é feita a partir das características da luz reflectida na sua superfície [32].

O elipsómetro apresenta algumas vantagens relativamente a outras técnicas utilizadas no estudo óptico dos materiais:

- Técnica não destrutiva;
- Permite medir espessuras de filmes de 200-40000Å;
- Permite determinar índices de refração e permitividade em filmes de espessura desconhecida;
- É possível realizarem-se medidas elipsométricas em meios ópticos transparentes, tais como ar ou líquidos;
- Permitem medidas com elevada precisão e resolução;
- Permitem monitorizar a qualidade dos filmes *in-situ*, sem danificar o filme depositado [34].

Neste trabalho, foram efectuadas medidas de espessuras dos bionanoconjugados depositados no eléctrodo e foi usado o elipsómetro **HORIBAJOBIN YVON UVISEL™** (ver Figura 13).



Figura 13 – Fotografia do elipsómetro **HORIBAJOBIN YVON UVISEL™** [34].

2.2.3 AFM (Microscópio de Força Atômica)

O AFM é um microscópio de força atômica de alta resolução. Trata-se de uma das ferramentas mais utilizadas e uma das mais poderosas em diversas áreas, como a imagiologia ou medição e manipulação de matéria à nanoescala.

O seu princípio de funcionamento consiste na medida das deflexões de um *cantilever*, em cuja extremidade livre existe uma sonda em forma piramidal cuja ponta é constituída por um único átomo. Estas deflexões são causadas pelas interações das Forças de *Van der Waals*, que actuam entre a ponta da sonda e a amostra (ver Figura 14).

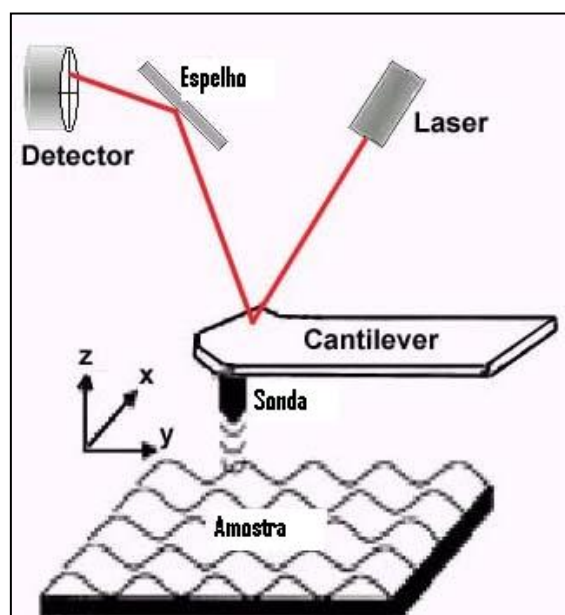


Figura 14 – Esquema do princípio de funcionamento de um AFM (adaptado de [35]).

O AFM tem diferentes modos de operação, que fornecem diversas possibilidades para fazer imagens de diferentes tipos de amostras e para gerar uma ampla gama de informações.

Existem vários modos de operação, o modo de contacto, o modo de não-contacto e o modo de contacto intermitente e referem-se à distância mantida entre a sonda e a amostra, no momento do varrimento e às formas de movimentar a sonda sobre a superfície a ser estudada, dando uma imagem da topografia ou amplitude da superfície da amostra, podendo gerar uma imagem tridimensional. A escolha do modo apropriado depende da aplicação específica que se deseja fazer.

Neste trabalho, as análises de AFM foram efectuadas na Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, pelo Investigador Peter Eaton e visaram a obtenção de uma imagem topográfica superficial dos bionanoconjugados, sujeitos ao modo de contacto intermitente. Foi usado o AFM Veeco Multimode, com um controlador *nanoscope IVa*.

2.2.4 VC (Voltametria Cíclica)

A VC é uma técnica qualitativa, usada na detecção de reacções de oxidação-redução, em processos electroquímicos [36].

Em VC, aplica-se uma variação de potencial ao eléctrodo e a perturbação origina uma resposta característica na forma da intensidade de corrente, na qual o método é baseado [37].

É uma técnica bastante versátil e eficaz no estudo de mecanismos de sistemas mediadores e que permite a sua caracterização através dos picos de intensidade obtidos e das modificações provocadas pela alteração da velocidade de varrimento. Permite também o estudo comparativo de materiais de eléctrodo e do estado superficial dos mesmos [38].

A VC “varre” o potencial a uma determinada taxa e mede a corrente. A curva experimental obtida é conhecida como curva de polarização ou voltamograma. Esta curva experimental, para valores positivos de corrente corresponde a reacções de oxidação e para valores

negativos de corrente, corresponde a reacções de redução. Quando essa curva atinge valores máximos de oxidação, estamos na presença de um pico anódico ou pico de oxidação, que corresponde a um valor máximo de corrente (I_{oxi}), o mesmo acontece para a curva de redução, quando esta atinge valores máximos de redução, estamos na presença de um pico catódico ou pico de redução, que corresponde a um valor mínimo de corrente (I_{red}) (ver Figura 15). Declives mais acentuados quer na curva de oxidação ou redução, correspondem a velocidades maiores de reacção e vice-versa.

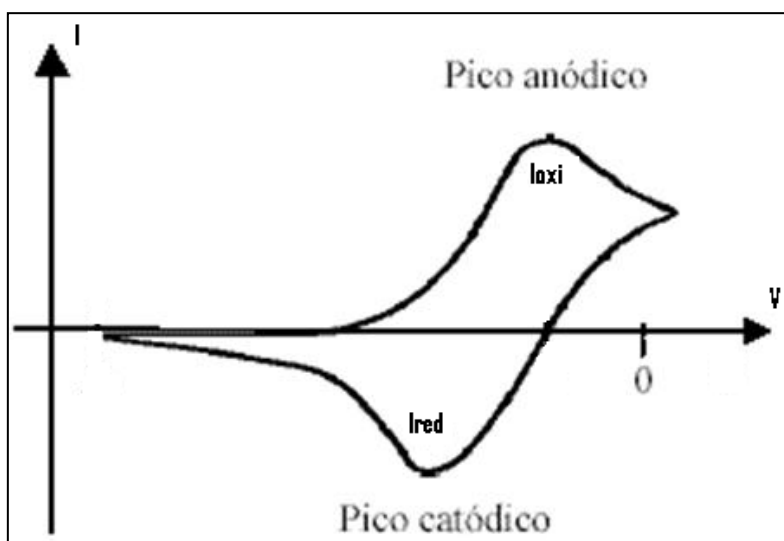


Figura 15 – Esquema de um Voltamograma genérico (adaptado de [39]).

Em VC é necessário a utilização de três tipos de eléctrodos (ver Figura 16):

- Eléctrodo de referência: Tem um potencial fixo e serve como referência da variação de potencial de outros eléctrodos, sendo o valor apresentado como uma diferença de potencial. Este eléctrodo deve ter um valor de potencial extremamente estável com o tempo, temperatura e pequenas alterações do sistema. Estes eléctrodos podem dividir-se em dois grupos:
 - Potencial fixo (como é o caso do eléctrodo de hidrogénio, eléctrodo de calomelanos e o eléctrodo Ag/AgCl);

- Indicadores (como o eléctrodo de vidro, eléctrodo de metal/iões metálicos, eléctrodo de iões selectivos).
- Eléctrodo auxiliar (ou secundário): Tem como função passar a corrente para o eléctrodo de trabalho sem influenciar a resposta da célula.
- Eléctrodo de trabalho: Eléctrodo onde ocorrem as reacções que se pretende estudar.

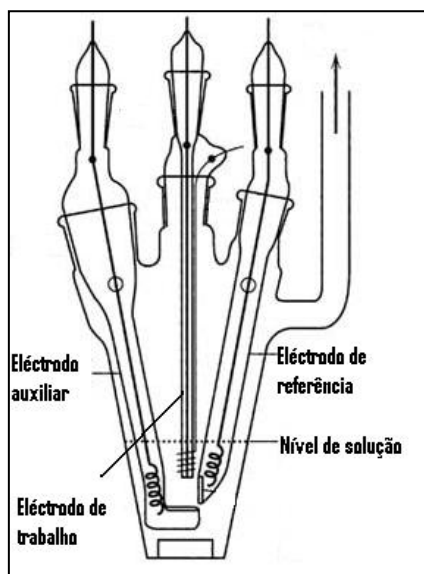


Figura 16 – Esquema de uma célula de VC, com os respectivos eléctrodos (adaptado de [40]).

A VC permitiu monitorizar as reacções da oxidoreductase, isto é, as reacções redox (ver Capítulo 1.1.4) catalisadas pela enzima tirosinase dos BNC produzidos.

Foi usado o Potencióstato Voltalab10 PGZ100 (ver Figura 17).



Figura 17 – Fotografia do Potencióstato Voltalab10 PGZ100

2.3 Procedimento Experimental

Tabela 6 – Reagentes e soluções utilizadas.

Reagentes utilizados	Soluções utilizadas ¹
– Acetona [CH ₃ COCH ₃]	
– Ácido clorídrico [HCl]	– Etanol [CH ₃ CH ₂ OH, 60%]
– Ácido sulfúrico [H ₂ SO ₄]	– Água régia [HNO ₃ /HCl, 1:3]
– Hidróxido de Sódio [NaOH]	– Solução piranha [H ₂ SO ₄ /H ₂ O ₂ , 4:1 @80°C]
– TYR, SIGMA EC 1.14.18.1, do Cogumelo <i>Agaricus bisporus</i> (12.500U/mL)	– Solução Tampão fosfato 10mM, pH 7
– MC 0.5mM	– Solução coloidal bionanoconjugados 2nM
– Tirosina 250U/ml	
– auT 5mM	
– Cyst 10mM	

¹ Todas as soluções foram preparadas com água *Milli-Q* (água desionizada, 18MΩ.cm⁻¹).

2.3.1 Deposição *Layer-by-layer*

Deposição *Layer-by-layer* em *cuvettes* de acrílico/placas de vidro

- Tratamento superficial da *cuvette*:
 - A superfície foi lavada com uma solução de etanol e com água destilada;
 - Foi então seca com um jacto de Árgon.
- Deposição de camada de proteína:
 - Foram colocados volumes diferentes de solução de TYR 500U/mL em cada uma das superfícies (*cuvette* de acrílico ou placa de vidro), 1,5ml ou 200µl de solução, respectivamente;
 - Esperou-se 15minutos e lavou-se em água destilada.
- Deposição de camada de AuNP CALNN :
 - Foram colocados volumes diferentes de solução coloidal AuNP CALNN 2nM, em cada uma das superfícies (*cuvette* de acrílico ou placa de vidro), 1,5ml ou 200µl de solução, respectivamente;
 - Esperou-se 30minutos e mediu-se a solução no Espectrofotómetro.

Este procedimento de deposição de camadas foi repetido tantas vezes quantas o número de camadas pretendido (ver Figura 18).

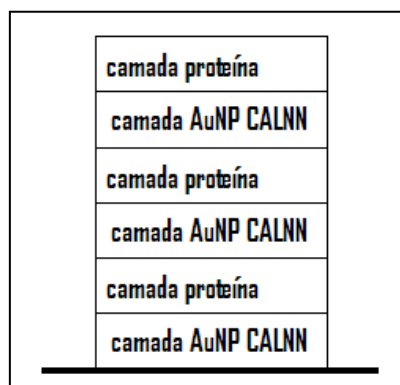


Figura 18 – Camadas *Layer-by-layer*.

■ Medição de actividade das camadas:

- Foi colocada a placa com o depósito formado por *Layer-by-layer* numa *cuvette* de 1,5ml de uma solução de MC 0,5mM;
- Após 5 minutos de incubação mediu-se a absorvância da solução por UV-Vis;
- Foi medida a solução de MC 0,5mM apenas e foi subtraída da anterior para detectar a actividade sem contabilizar a absorvância do substrato apenas (ver Figura 19).

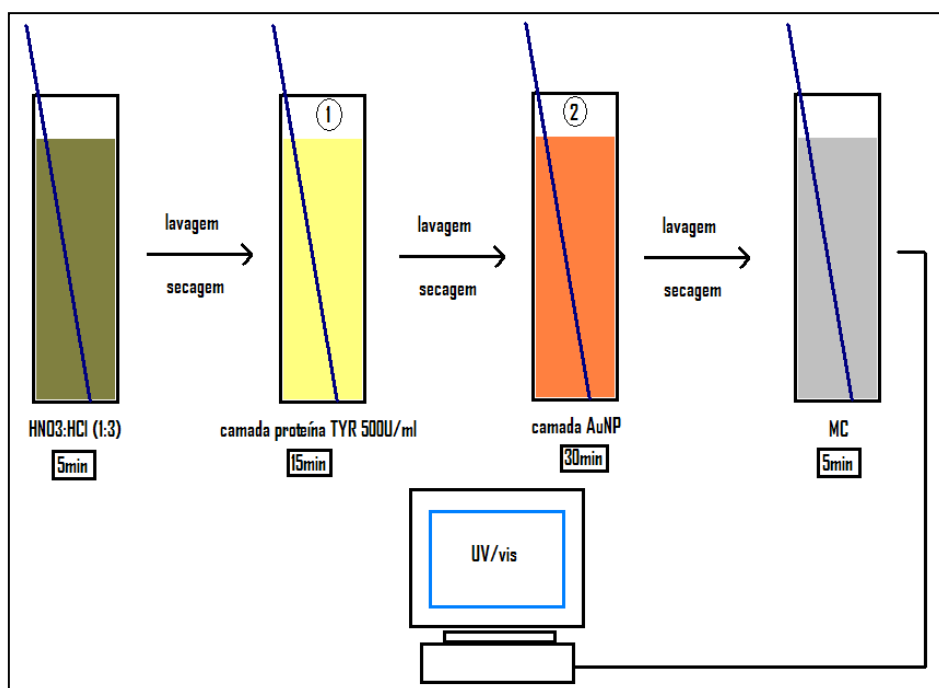


Figura 19 – Esquema da deposição *Layer-by-layer* em cuvettes de acrílico/placas de vidro (repetição do passo ① e do passo ②, de acordo com o número de camadas pretendido).

2.3.2 Deposição de monocamadas de bionanoconjugados

Deposição de um filme fino de Au em placas de vidro por evaporação (canhão de electrões)

■ Deposição de Au por Canhão de electrões, em vidro:

- Os vidros foram lavados com detergente, para retirar o excesso de gordura e lavados, em banho de ultra-sons, com álcool e acetona, em duas passagens. No final, foram secos com jacto de Azoto;
- Os vidros foram colocados no porta-substratos e introduzidos na câmara;
- Esperou-se até atingir o vácuo secundário (Pressão inicial) e iniciou-se a deposição, de acordo com as condições de deposição descritas na Tabela 7;
- Foi retirado o vácuo da câmara, aberta e retiraram-se os vidros.

Tabela 7 – Condições de deposição por canhão de electrões.

Deposição nº	Material a depositar:	Densidade/Impedância acústica	Condições
2102	Ti/Au	Dens.: 4,5/19,3 Imp. Ac.: 0,628/0,381	P _{Inicial} : $4,8 \times 10^{-6}$ mbar T _{Inicial} : 24° C I _{Filamento} : 0,1A Esp _{Final} : 70/1500Å Razão de Evaporação: $4/4,8 \text{Å.s}^{-1}$
2115	Cr/Au	Dens.: 7,2/19,3 Imp. Ac.: 0,305/0,381	P _{Inicial} : 8×10^{-7} mbar T _{Inicial} : 60° C; T _{Final} : 72° C Esp _{Final} : 50/1500Å Razão de Evaporação: 2Å.s^{-1}
2295	Cr/Au	Dens.: 7,2/19,3 Imp. Ac.: 0,305/0,381	P _{Inicial} : $4,8 \times 10^{-5}$ mbar; P _{Final} : $2,9 \times 10^{-5}$ mbar Esp _{Final} : 50/1500Å Razão de evaporação: $1,7 \text{Å.s}^{-1}$
2440	Cr/Au	Dens.: 7,2/19,3 Imp. Ac.: 0,305/0,381	P _{Inicial} : $4,4 \times 10^{-5}$ mbar; P _{Final} : $1,5 \times 10^{-5}$ mbar T _{Inicial} : 20° C; T _{Final} : 30° C I _{Filamento} : 0,05A Esp _{Final} : 50/1500Å Razão de evaporação: $1,1 \text{Å.s}^{-1}$

Deposição de uma SAM de bionanoconjugados

- Deposição de camada controlo de proteína:
 - Foi colocada na superfície a depositar, 200µl de uma solução de proteína TYR 500U/ml;
 - Esperou-se 15 minutos e lavou-se em água destilada.

- Deposição de camada de bionanoconjugados:
 - Foi colocada na superfície a depositar 200µl de uma solução coloidal de bionanoconjugados 2nM;
 - Esperou-se 30 minutos e lavou-se em água destilada.

- Medição de actividade das camadas:
 - A amostra foi colocada no interior de uma *cuvette* de Quartzo, que continha 1ml de uma solução de MC 0,5mM;
 - Esperou-se 5 minutos e mediu-se a solução no Espectrofotómetro;
 - Foi medida a solução de MC 0,5mM e subtraída da anterior para detectar a actividade.

2.3.3 Deposição de uma SAM intermédia

Deposição de uma SAM intermédia (esta camada vai potenciar a imobilização do bionanoconjugado à superfície de AuNP previamente depositadas)

■ Deposição de camada de Cyst (Cisteamina):

- Foi colocada na superfície a depositar, 200µl de uma solução de Cyst 10mM, previamente oxigenada;
- Esperou-se 60 minutos e lavou-se em água destilada.

■ Deposição de camada de auT (Aminoundecanotiol):

- Foi colocada na superfície a depositar, 100µl de uma solução de auT 5mM;
- Esperou-se 60 minutos e lavou-se em água destilada.

Foi posteriormente depositada uma camada de bionanoconjugados sobre a SAM de Cyst, de auT ou directamente sobre Au, como controlo (ver Capítulo 2.3.2).

2.3.4 Espectroscopia de UV/vis

Medição de actividade das *Layer-by-layer* e depósitos de bionanoconjugados

■ Parâmetros de medição:

- A determinação de actividade dos bionanoconjugados depositados foi efectuada por UV-Vis. O espectrofotómetro foi ligado e foi feita a linha de base, com uma célula de Quartzo, utilizando água *Milli-Q* como referência;
- Foi traçado o espectro das soluções após 5 minutos de incubação na solução de MC 0,5mM.;
- A gama de medição de actividade foi feita na gama do visível, dos 325-700nm

A determinação da actividade dos biossensores por Espectroscopia de UV-Vis é feita de um modo indirecto, na gama do visível, dos 325-700 nm.

Em primeiro lugar é medido o espectro de absorvância da solução MC e é inserido nessas solução o biossensor. Após 5 minutos de incubação do biossensor nessa solução é retirado e é traçado novo espectro de absorvância dessa solução. A subtracção dos dois espectros dá-nos a actividade dos biossensores (foi retirada a contribuição da plasmónica das AuNP).

O biossensor reage com a solução e existe consumo de substrato, como tal, é necessário fazer essa subtração, por forma a eliminar a presença do MC e obter apenas a actividade pretendida.

2.3.5 Elipsometria Espectroscópica

Medidas de Elipsometria Espectroscópica

- Aquisição da medida de Elipsometria:
 - O biossensor foi colocado no porta-amostras e fez-se a medida.

Este procedimento de medidas de Elipsometria Espectroscópica foi repetido tantas vezes quantas o número de amostras e em diferentes pontos da mesma amostra.

- Criação do modelo da amostra:
 - Foi criado um *New Model*. Esta opção abriu uma janela que permitiu ao utilizador adicionar *Layers* necessárias para modelar o comportamento óptico da amostra, especificando a espessura de cada camada, assim como o material da qual é constituída, de acordo com um modelo clássico de oscilação. Foi feito numa gama alargada (1.5 – 6.5eV), num ângulo fixo de incidência de 70°.

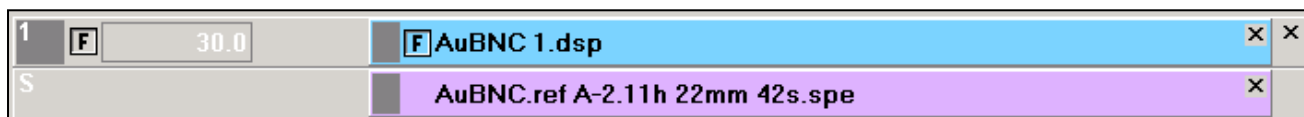


Figura 20 – Modelo de duas camadas, feito no elipsómetro HORIBA Jobin Yvon.

A camada representada a lilás, simula a superfície do biossensor, depositada com Au, por canhão de electrões, vai ser a camada de referência e a camada representada a azul, simula a camada de bionanoconjugados depositada (ver Figura 20). A espessura desta camada é obtida, recorrendo a um *fitting* do modelo à média experimental, obtendo-se a espessura dessa camada em *Ångstrom*. A camada de AuBNC foi modelada opticamente com recurso ao modelo do oscilador clássico de *Lorentz-Drude*, constituído por 5 parâmetros variáveis (ϵ_∞ ; ϵ_s ; ω_t ; ω_p ; Γ_0 e Γ_d) que correspondem respectivamente a Permittividade de alta energia do material, Constante dieléctrica estática do material, Frequência de ressonância, Frequência de

plasma e Amortecimento (um do modelo de *Lorentz* e um do modelo de *Drude*), ver Figura 21.

$$\varepsilon = \varepsilon_{\infty} + \frac{(\varepsilon_s - \varepsilon_{\infty})\omega_t^2}{\omega_t^2 - \omega^2 + i\Gamma_0\omega} + \frac{\omega_p^2}{-\omega^2 + j\Gamma_d\omega}$$

Figura 21 – Fórmulas usadas na criação do modelo clássico de oscilação, por Elipsometria Espectroscópica (Modelo de Lorentz, à esquerda e Modelo de Drude, à direita).

O parâmetro que define a qualidade do fitting é χ^2 e representa erro entre a simulação e a medida experimental, considerando-se que um bom *fitting* é obtido para $\chi^2 < 1$.

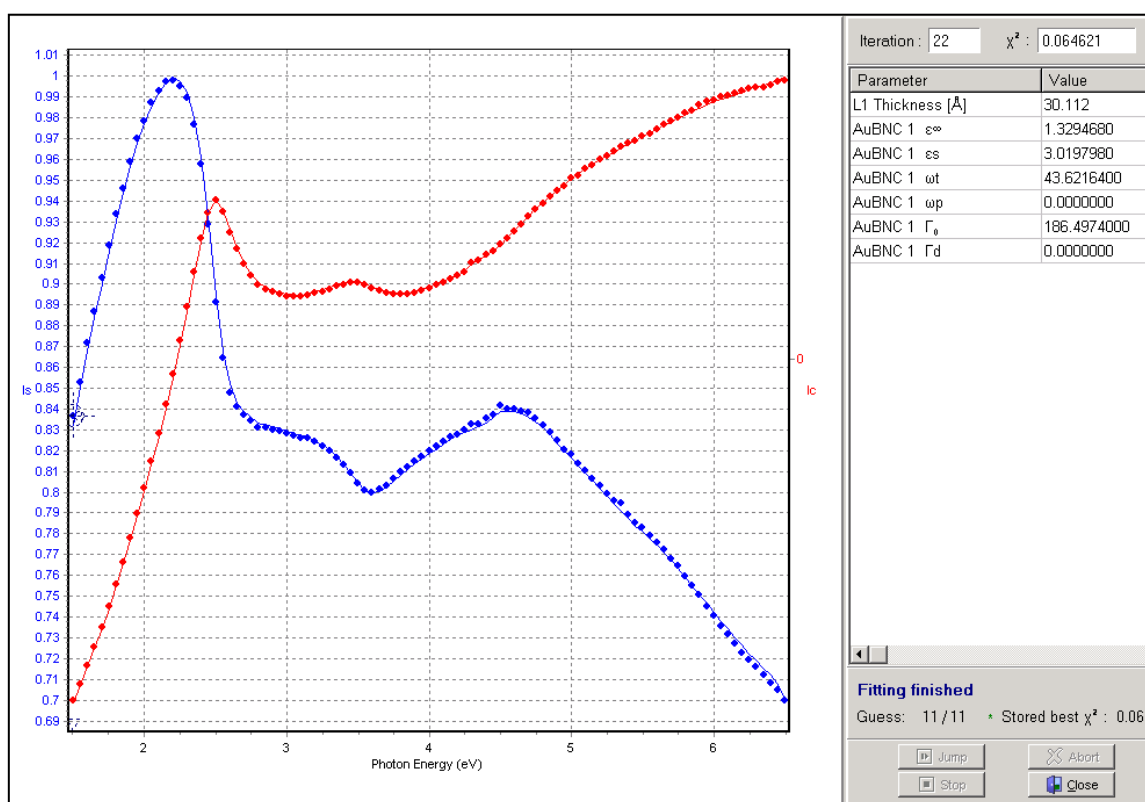


Figura 22 – Ilustração do *Fitting* entre o modelo (linha) e medida experimental (pontos) ilustrando o ajuste perfeito do modelo à média experimental. O erro χ^2 obtido foi de 0.06 e a espessura 30,1 Å.

2.3.6 AFM

Medidas de AFM

- Aquisição das imagens de AFM:
 - As imagens foram obtidas em modo de contacto intermitente (*tapping mode*), com uma frequência de ressonância de cerca de 300kHz e uma *tip* de *single crystal diamond* (SCD, Mikromasch);
 - Cada amostra foi examinada em áreas de 1, 2 e 6µm, com uma resolução de 512pixels;
 - Os parâmetros de rugosidade foram calculados recorrendo a *software Gwyddion 2.17* e o diâmetro das nanopartículas foi calculado baseado numa rotina interna para análise de perfis de linhas.

2.3.7 VC (Voltametria Cíclica)

Medidas de VC

■ Aquisição das medidas de VC:

- Foram montados na célula os eléctrodos de referência [SCE] e o eléctrodo auxiliar [Pt] (ver Figura 22);
- Verificou-se o nível de solução de substrato (MC 0.5mM), na célula;
- Colocou-se a amostra (eléctrodo de trabalho) na célula²;
- Ligou-se o PC e iniciou-se o programa *VOLTAMASTER4*;
- Foram definidos os parâmetros de medição.

Tabela 8 – Parâmetros de medição de VC.

Parâmetros de medição	
Potencial 0	OCP
Amplitude 1	-500mV
Amplitude 2	700mV
Scan rate	25mV.s ⁻¹

Este procedimento de medidas de VC foi repetido tantas vezes quantas o número de amostras e com diferentes ciclos por amostra.

² Teve-se em atenção a face do biossensor com o depósito de bionanoconjugado estar voltada para o eléctrodo de trabalho.

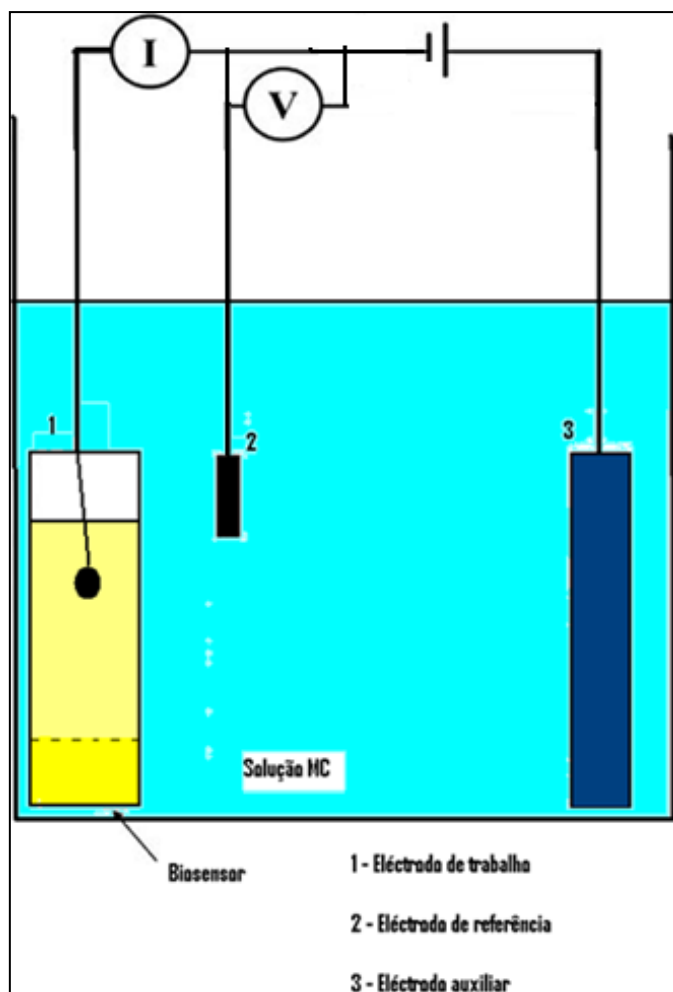


Figura 23 – Esquema de montagem dos eléctrodos, para medidas de VC.

■ Preparação do eléctrodo de trabalho (biossensor):

- Os eléctrodos foram soldados a um fio de cobre e isolados com Araldite®, por forma a evitar curto-circuitos, deixando uma zona a descoberto;
- Foi medida a área de contacto com a solução e mergulhados na mesma;
- O voltamograma de cada um foi traçado e a solução mudada com cada eléctrodo.

Capítulo 3

Apresentação e discussão dos resultados

3. Apresentação e discussão dos resultados

3.1 Optimização dos parâmetros de incubação/detecção de actividade enzimática

3.1.1 Medição da actividade da enzima.

Foram feitas diversas experiências (Anexo 1), começando com valores elevados de concentrações, de enzima e substrato e fez-se uma gama de ensaios, baixando sucessivamente os valores de concentração de modo a determinar os limites mínimos de detecção de 4-metil catecol (MC) e tirosina (Y) (ver Figura 24), ou seja, o objectivo foi determinar qual a concentração de enzima e substrato que teriam o menor valor possível de absorvância detectável acima da linha de base de absorvância do sistema. Os valores de absorvância correspondem aos productos da reacção obtidos a 400 e a 475nm, para MC e Y, respectivamente.

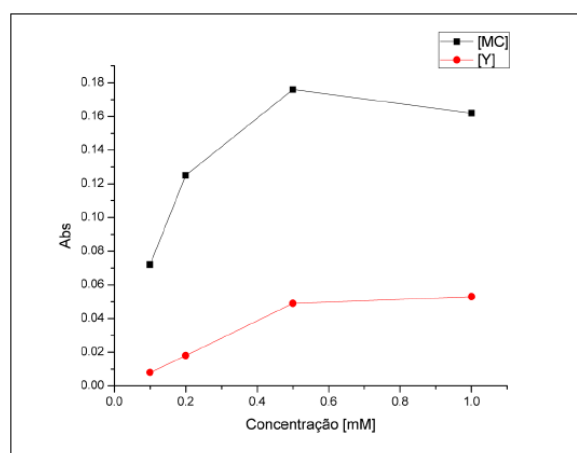


Figura 24 – Valores de absorvância para 400 e 475nm, para substrato MC0.5U e Y2.5U.

Foram encontrados os valores mínimos aceitáveis de concentração de substrato (Y ou MC), a usar nos biossensores e encontram-se representados na Tabela 10, que correspondem aos valores mínimos e as gamas de enzima e substrato testados estão detalhados no Anexo 1. Resumidamente, para uma concentração de 0.5U/ml de TYR, podemos usar como

concentração mínima de substrato uma solução de MC 0.5mM e, analogamente, para uma concentração de TYR de 2.5U/ml, podemos usar uma solução de Y 0.1mM.

Tabela 9 – Optimização dos limites de detecção da actividade enzimática, na presença de MC e Y como substrato, respectivamente, em cima e em baixo.

0.5U/ml	MC (μl)	TYR (μl)	Tampão (μl)	Água (μl)	Tempo (min)
0.5mM	200	16	200	584	5

2.5U/ml	Y (μl)	TYR (μl)	Tampão (μl)	Água (μl)	Tempo (min)
0.1mM	10	20	200	770	15

3.1.2 Influência do pH na agregação de AuNP CALNN em solução.

Foi efectuado um estudo (ver Figura 24) da influência do pH na agregação de uma solução de AuNP CALNN 2nM. O objectivo foi estudar o início de agregação das AuNP em solução e inferir sobre o pH óptimo a usar na construção do biossensor.

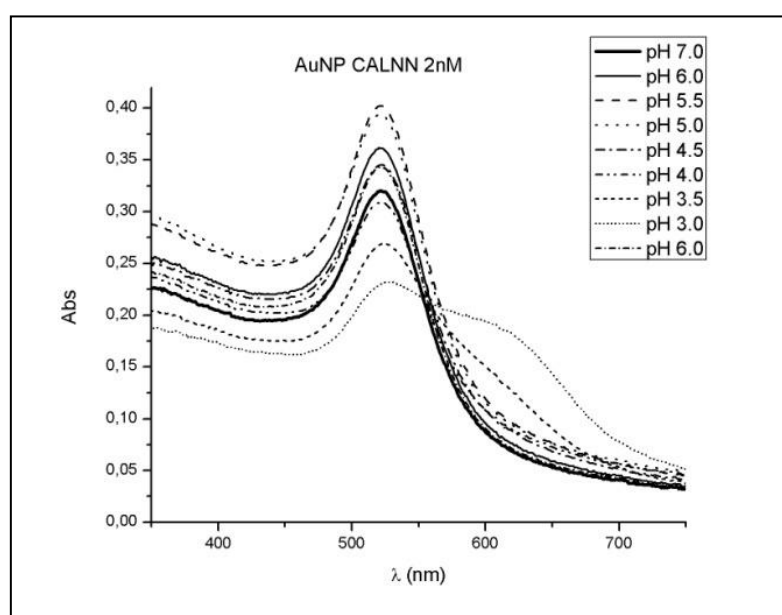


Figura 25 – Variação do pH e estudo da agregação das AuNP CALNN 2nM.

Pela Figura 26, é possível observar nos espectros de absorção, o aparecimento de uma banda entre os 620 e os 630nm e uma correspondente diminuição da absorvância a 525nm, o que indica agregação das AuNP em solução. Ou seja, para pH inferior a 4.0, as AuNP começam a agregar e à medida que o pH da solução baixa, aumenta a banda da plasmónica para AuNP agregadas a 630nm com concomitante diminuição do máximo de absorvância da forma não agregada a 525nm.

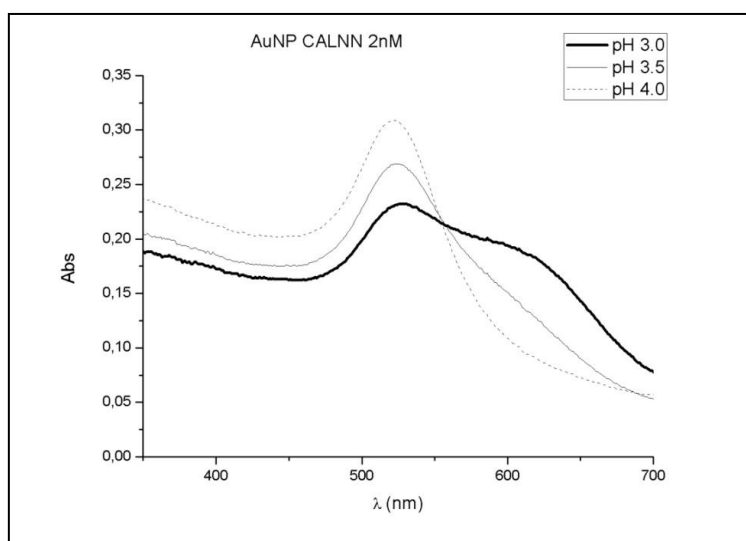


Figura 26 - Variação do pH e estudo da agregação das AuNP CALNN 2nM.

3.1.3 Influência do tempo de incubação da enzima (TYR) em função do pH, em AuNP-CALNN.

Com o intuito de verificar a influência das AuNP na actividade da TYR, foram incubadas soluções de AuNP e TYR durante 30 minutos e, só após este tempo foi adicionado o substrato Y e medida a actividade após 15 minutos de incubação. Estes resultados foram comparados com a actividade obtida por adição imediata de Y sem pré-incubação, ambos a diferentes pH, como se pode ver na Figura 27.

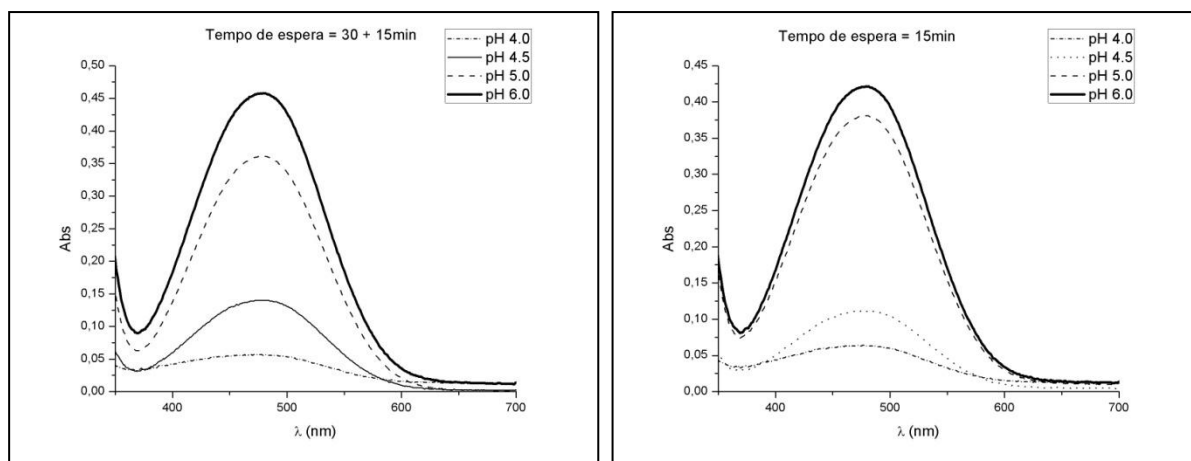


Figura 27 – Espectros de absorvância da actividade enzimática, para um tempo de incubação de enzima e AuNP CALNN de 30 minutos seguida da adição de Y (à esquerda) e adição imediata de Y (à direita) e em função do pH.

Pode verificar-se pela Figura 28 que não existem diferenças significativas na actividade da enzima para ambos os casos, indicando que a enzima não sofre inactivação na presença de AuNP-CALNN³. Pode também verificar-se que a sua conjugação e deposição nos eléctrodos deverá ser levada a cabo a pH superior a 5.

O tempo de espera permite ver se a enzima está estável, ou seja, mostra se há inactivação da TYR durante a incubação com AuNP, de modo a formar os bionanoconjugados ou não. As diferenças em função do tempo de espera não são significativas, como tal não há inactivação. Por outro lado, a enzima só está activa para um pH superior a 5, abaixo do qual perde a actividade.

³ Foi subtraída a contribuição da plasmónica das AuNP.

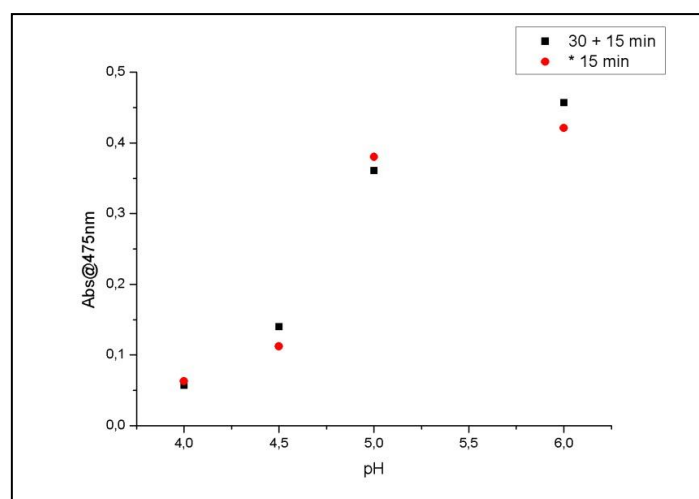


Figura 28 – Espectro de absorvância da actividade enzimática, em função do tempo de espera de enzima (TYR) + substrato (Y), sobrepostos e em função do pH.

3.2 Layer-by-layer

3.2.1 Estudo da actividade enzimática nas camadas *Layer-by-layer*.

Foram feitos diversos estudos de *Layer-by-layer*, com diferente número de camadas (ver Tabela 10). O número de camadas em *Layer-by-layer* e a sua deposição influenciam directamente a actividade enzimática, na medida em que um número excessivo de camadas pode não aumentar a actividade das mesmas e um número reduzido de camadas pode ser propício para um valor “óptimo” de actividade quando comparado com diferente número de camadas. O facto de a última camada *Layer-by-layer* ser uma camada de enzima ou uma camada de AuNP também influencia a medição de actividade.

Tabela 10 – Estrutura, número de camadas e valores de absorvância a 400nm dos diferentes *Layer-by-layer*⁴.

Amostras	Camadas	Valor de Absorvância (@400nm)
Lbl 1	Enzima-AuNP-Enzima	0,05
Lbl 2	Enzima-AuNP-Enzima-AuNP	0,02
Lbl 3	Enzima-AuNP-Enzima-AuNP-Enzima	0,09
Lbl 4	Enzima-AuNP-Enzima-AuNP- Enzima-AuNP-Enzima-AuNP- Enzima	0,06
Lbl 5	Enzima-AuNP-Enzima-AuNP- Enzima-AuNP-Enzima-AuNP- Enzima-AuNP- Enzima	0,03

Foi feito outro estudo, independente do anterior, como se pode ver na Figura 29, onde é possível observar os espectros obtidos para uma placa de vidro com 5 camadas alternadas de enzima-AuNP, onde se vê apenas a plasmónica de absorção típica das AuNP (525nm) na primeira e segunda camadas de AuNP depositadas. A deposição de sucessivas camadas de AuNP-TYR causa um desvio do pico da plasmónica de 525nm para 575nm. Tal pode ser

⁴ A linha de base foi ajustada.

devido à interacção crescente entre as AuNP das camadas alternadas, levando a um desvio da plasmónica para comprimentos de onda maiores (*red-shift*), promovendo a agregação entre camadas.

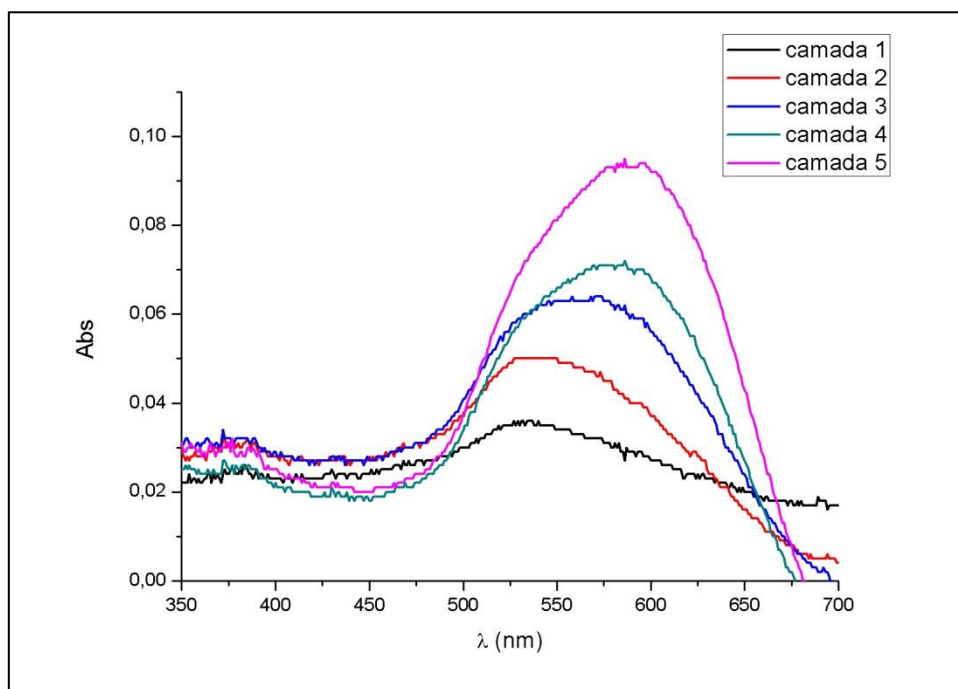


Figura 29 – Espectros da plasmónica de AuNP depositadas em camadas sucessivas (alternadas com TYR) por *Layer-by-layer*.

A Figura 29 permite verificar que as AuNP se estão a depositar com sucesso, sendo que as camadas de proteína intermédias permitem a deposição da camada de AuNP seguinte, criando assim um biocompósito por *Layer-by-layer*, é possível também observar a actividade dos *Layer-by-layer* com diferente número de camadas. É possível ver que o facto de se aumentar o número de camadas, não vai aumentar também a actividade, pelo contrário, apenas uma ou duas camadas atingem valores mais elevados de actividade.

Por outro lado, a diminuição de actividade registada, há medida que se vão adicionando as camadas, pode ser devida a uma inibição da actividade enzimática por parte da AuNP nas camadas iniciais, visto que vai ocorrendo agregação entre as camadas de AuNP.

3.3 Bionanoconjugados

3.3.1 Estudo da actividade enzimática nos bionanoconjugados.

Os bionanoconjugados são sintetizados de acordo com diferentes métodos, como foi descrito no Capítulo 1.1.5, onde se forma um complexo entre uma nanopartícula metálica funcionalizada e uma biomolécula.

O bionanoconjugado é estável, se guardado em condições favoráveis de luz e temperatura (ambiente escuro, temperatura ambiente ou 4° C) e bastante robusto ao longo do tempo. Apresenta uma maior sensibilidade quando aplicado em biossensores electroquímicos e é de fácil aplicação (41).

O processo de formação dos bionanoconjugados é em tudo semelhante ao processo de funcionalização das AuNP CALNN . A TYR é depois adicionada à solução coloidal obtida e a enzima liga-se às AuNP CALNN por interacção electrostática.

A Figura 30 ilustra as plasmónicas de bionanoconjugados e de AuNP CALNN apenas, ambos com máximos de absorvância a 525nm, a 1nM.

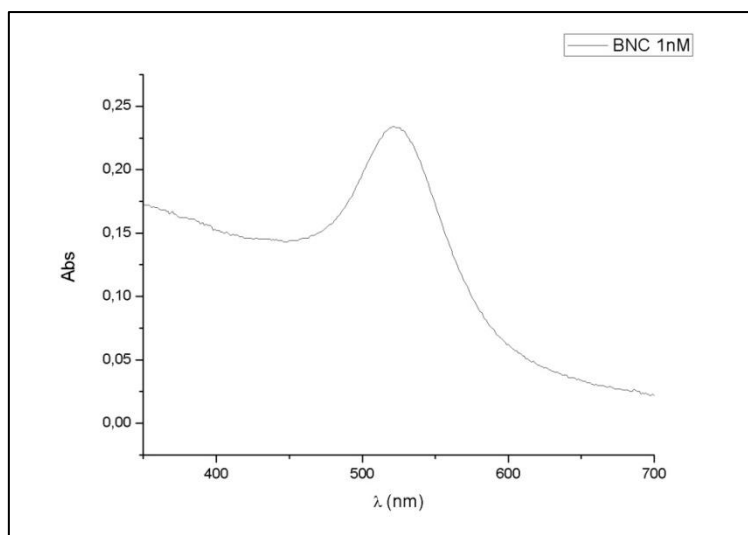


Figura 30 – Espectro de absorvância dos bionanoconjugados (AuNP CALNN 1 + 250nM TYR em tampão fosfato pH 7).

Relativamente aos bionanoconjugados 1nM, foi feito um estudo semelhante a nível de agregação induzida por pH (ver Figura 31). O objectivo foi determinar a que pH os bionanoconjugados agregariam e inferir sobre o pH óptimo a utilizar na construção do biossensor (Anexo 2).

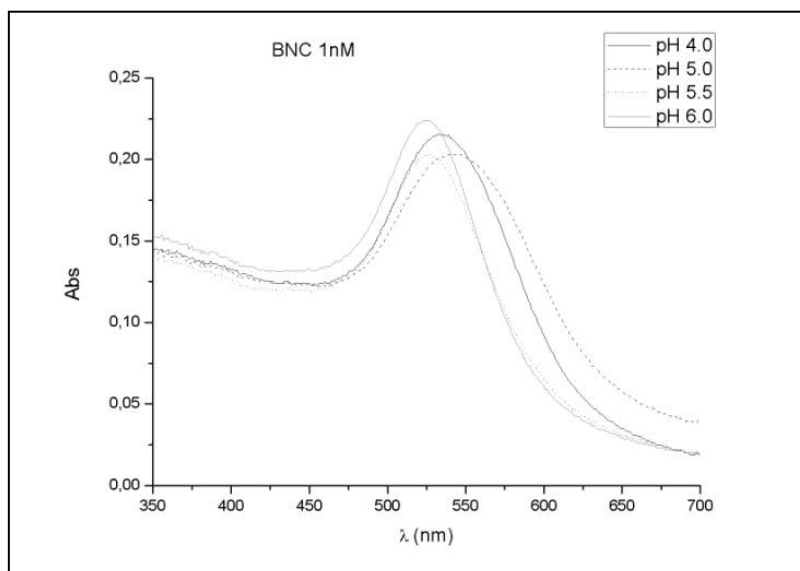


Figura 31 – Estudo da agregação dos bionanoconjugados (AuNP CALNN 1nM + TYR), através do pH.

Através da observação da Figura 31, nota-se o desvio do pico de absorção com a diminuição do pH, desvio esse que demonstra o início da agregação das AuNP em solução a pH 5.0. Podemos inferir um pH óptimo de manipulação dos bionanoconjugados não inferior a 5.

Após ter sido feito o estudo dos bionanoconjugados a nível de pH, agregação e actividade, foi efectuado um estudo de estabilidade enzimática dos bionanoconjugados ao longo do tempo.

Os bionanoconjugados foram preparados, armazenados no frigorífico e a sua actividade foi medida após 1 dia, 1 semana e 2 semanas, por forma a estudar a sua estabilidade e robustez (ver Figura 32).

De acordo com os valores da Figura 32, nota-se a manutenção da actividade, apesar de apresentar um valor baixo, mesmo após duas semanas. A actividade apresenta pequenas variações com o tempo de armazenamento a 4° C que não são significativas. No entanto, os resultados indicam que é possível guardar o biossensor uma a duas semanas até ao período de utilização, após esse período a sua actividade decresce.

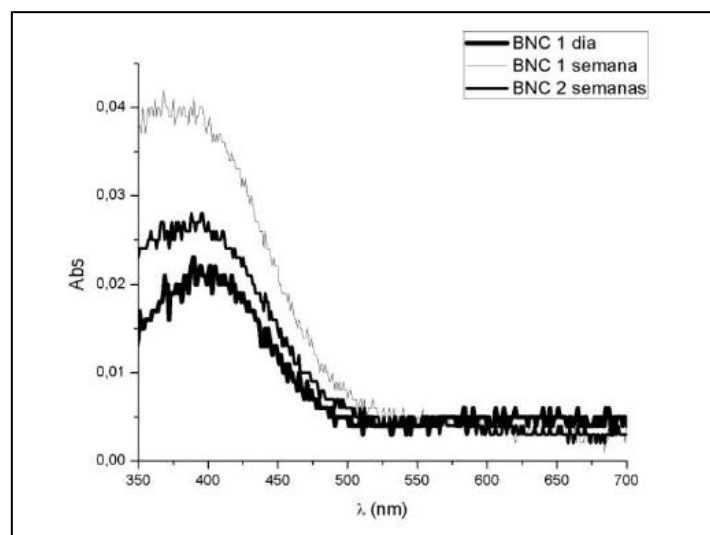


Figura 32 –Absorvância dos bionanoconjugados, a 400 nm, em dias diferentes.

Tabela 11 – Valores de Absorvância a 400 nm, em dias diferentes.

Amostra	Absorvância (@400nm)
BNC 1 dia	0.02
BNC 1 semana	0.04
BNC 2 semanas	0.03

Posteriormente, foram efectuados diferentes depósitos de bionanoconjugados, por forma a serem efectuadas medidas de Elipsometria Espectroscópica, para medir a espessura das camadas depositadas. Estas medidas foram efectuadas após a medição de actividade de cada um dos bionanoconjugados e os valores de actividade mais significativos encontram-se representados na Tabela 12.

Tabela 12 – Bionanoconjugados (AuNP CALNN 2nM), sem ou com SAM de Cyst ou auT e respectivos valores de espessura e absorvância, obtidos por Elipsometria Espectroscópica e Espectroscopia UV-Vis@400nm.

SAM	Abs@400nm	Espessura (Elipsometria) [nm]
Cyst + BNC (“seco” no frigorífico), com pré-tratamento de piranha	0.062	2.19 ±0.48
BNC (“seco” no frigorífico)	0.155	4.48 ±1.08
BNC	0.075	3.65 ±1.26
auT + BNC	0.100	1.66 ±0.43
Cyst + BNC	0.135	3.90 ±1.30

Através da observação dos valores da Tabela 12, podemos verificar que um pré-tratamento com solução piranha (por forma a tornar a superfície limpa com o intuito de melhorar a adsorção de bionanoconjugados no eléctrodo), não influenciou significativamente o valor de absorvância obtido (Amostra Cyst + BNC (“seco” no frigorífico), com pré-tratamento de piranha).

Esperava-se que ao substituir a SAM de Cyst por auT, os valores de actividade aumentassem, mas não foi o observado. Os valores de actividade da Amostra auT + BNC são superiores, quando comparados com a Amostra BNC, no entanto, quando comparados com os restantes valores, encontram-se abaixo (Anexo 2).

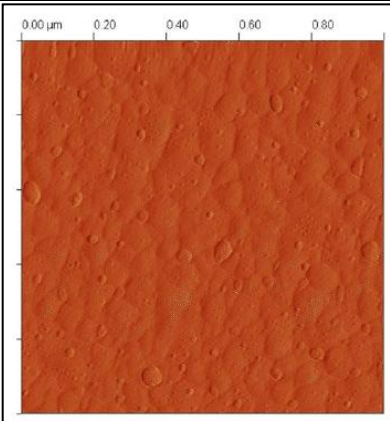
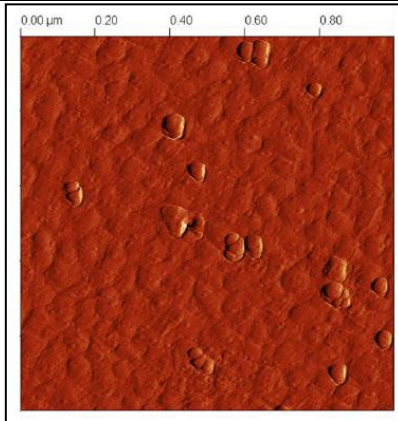
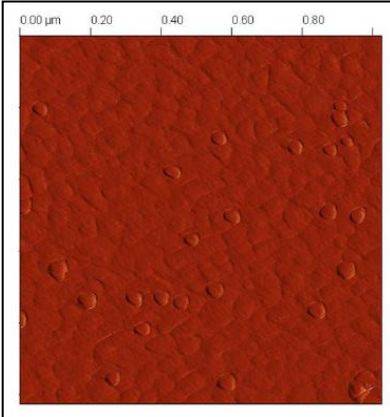
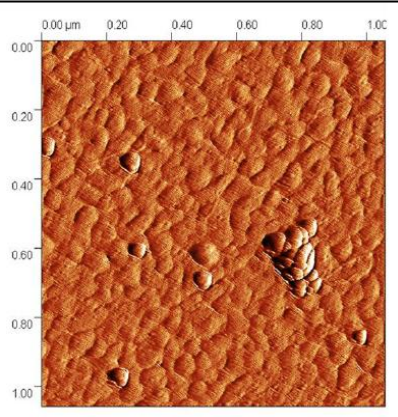
Pelos valores da Tabela 12, vemos que o valor mais elevado de absorvância é o valor para a Amostra BNC (“seco” no frigorífico), que tem apenas um depósito de bionanoconjugados, sem qualquer tipo de pré-tratamento e foi seca no frigorífico (para manter/preservar a actividade enzimática).

Foram feitas medições de espessura das camadas em cada bionanoconjugado.

Continuando a análise dos valores da Tabela 12, vemos que o valor obtido para a espessura da amostra BNC (“seco” no frigorífico), com pré-tratamento de piranha (por Elipsometria Espectroscópica), é o valor mais elevado dos bionanoconjugados analisados (~4.5nm), correspondendo à actividade enzimática mais elevada ($A_{400} = 0.155$).

Foram efectuados ensaios de AFM (Anexo 3), por forma a verificar que a imobilização de bionanoconjugados na superfície tinha sido bem sucedida. Esta técnica permitiu também a determinação da distribuição espacial dos bionanoconjugados depositados e a percentagem da superfície do eléctrodo coberta por bionanoconjugados. Na Tabela 13 encontram-se imagens topográficas dos diferentes depósitos efectuados sobre uma superfície de Au. Por exemplo, no último caso Au-Cyst-BNC, presente na Tabela 13, vemos uma zona de aglomerados, que poderão ser bionanoconjugados agregados, já que na altura da deposição, foi observada a coloração azul-arroxeadada na solução de preparação, característica de agregação de AuNP.

Tabela 13 – Imagens topográficas, por AFM, de diferentes depósitos efectuados sobre uma superfície de Au.

<u>Amostra</u>	<u>AFM</u>	<u>Amostra</u>	<u>AFM</u>
Au		Au-auT-BNC	
Au-BNC		Au-Cyst-BNC	

No entanto, não pode ser feita uma avaliação exaustiva sobre a eficácia da imobilização de bionanoconjugados nos eléctrodos, visto que apenas foi feita uma análise para cada amostra. No entanto, na mesma amostra em que foi feita a análise por AFM, foi também efectuada uma medição de Elipsometria Espectroscópica, por forma a determinar a espessura média depositada para cada amostra (Tabela 14).

Tabela 14 – Espessura média dos depósitos, determinada por Elipsometria Espectroscópica e % Superfície coberta e contagem de BNC. μm^{-2} , determinados por AFM.

<u>Amostra</u>	Elipsometria Espectroscópica	AFM	
	Espessura [nm]	BNC. μm^{-2}	Superfície coberta (%)
Au	5.5 \pm 0.7	0.5	1.0
Au-auT	11.4 \pm 0.3	0.8	1.4
Au-Cyst	10.3 \pm 1.1	0.8	1.4
Au-TYR	n.d.	n.d.	n.d.
Au-BNC	19.3 \pm 1.4	4.7	6.4
Au-auT-BNC	27.1 \pm 2.6	6.0	10.6
Au-Cyst-BNC	17.9 \pm 1.7	4.2	7.4

Os resultados obtidos tanto por Elipsometria como por AFM e que podem ser observados na Tabela 14 estão dentro do que seria esperado, os eléctrodos com depósitos de bionanoconjugados apresentam uma espessura superior à do Au apenas (e respectivos controlos com SAM) e uma maior percentagem de área coberta. No caso dos eléctrodos com SAM de Cyst e auT, a própria cadeia de auT é maior (em comprimento) do que a cadeia de Cyst, porque apresenta um maior número de carbonos, logo, a espessura medida por elipsometria também é maior. Estes resultados indicam que uma maior quantidade de bionanoconjugados foram depositados no caso de um eléctrodo com uma SAM de auT.

Relacionando com os valores de actividade presentes na Tabela 12 e tendo em conta os valores obtidos por AFM, da %superfície coberta e BNC. μm^{-2} , é possível dizer que o facto de ter mais bionanoconjugados depositados no eléctrodo não é necessariamente melhor para a actividade, como se pode ver pelo exemplo do Au-BNC, que apresenta valores inferiores de % de superfície coberta, quando comparados com os valores do Au-auT-BNC ou Au-Cyst-BNC e, no entanto, é o que apresenta um maior valor de actividade. Por outras palavras, a actividade registada por bionanoconjugado é superior no caso dos depósitos de Au-BNC, o que sugere a ocorrência de perda de actividade enzimática nos bionanoconjugados depositados sobre SAM.

Os valores de Elipsometria referentes à espessura de cada SAM são baixos, relativamente ao que era esperado, porque na análise da espessura, os bionanoconjugados à superfície estão afastados uns dos outros e em pequena quantidade (como é possível observar pela Tabela 13), o que faz com que a medida elipsométrica seja uma média da altura dos depósitos e não a altura de cada um.

3.4 Medidas de Voltametria Cíclica

As medidas de VC foram efectuadas em amostras com diferentes camadas de bionanoconjugados (Anexo 4), com a mesma gama e velocidade de varrimento (Ver Tabela 8).

O objectivo da VC foi monitorizar as reacções de oxidação e redução, catalizadas pela TYR e determinar, de uma forma qualitativa a formação de produto de reacção, a *o*-quinona.

Foram feitos diversos ensaios. Foi feito um ensaio num eléctrodo depositado apenas com Au, que serviu como controlo. Os restantes eléctrodos foram feitos com deposição de várias SAMs ou camada de enzima ou bionanoconjugado ou SAM e bionanoconjugado, por forma a comparar cada um deles.

Da análise da Figura 33, foi possível obter os valores dos picos de oxidação e redução, I_{oxi} e I_{red} , respectivamente e construir a Tabela 15, para cada uma das camadas de bionanoconjugados (para o 1º e 2º ciclos de varrimento).

Pela observação do gráfico da Figura 33, vê-se que o eléctrodo de Au está a reagir ao electrólito (solução de MC), visto que se obtém um sinal eléctrico, o que indica que há interacção entre a solução e a superfície do eléctrodo. Pode ser indicativo de oxidação, não a nível macroscópico, mas localmente existem trocas à superfície.

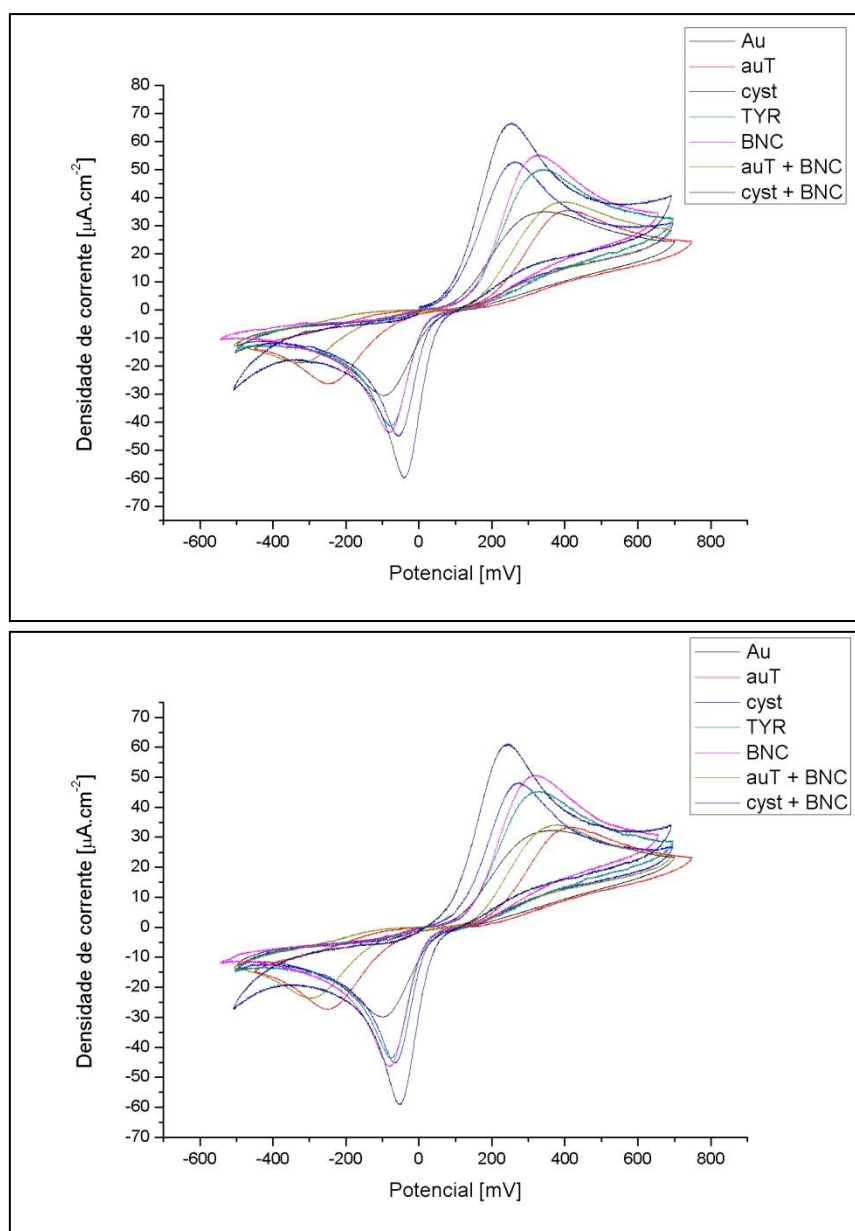


Figura 32 – Voltamograma, para diferentes camadas de bionanoconjugados depositadas sobre Au, numa solução de MC (1º e 2º ciclos de varrimento, em cima e em baixo, respectivamente).

Tabela 15 – Valores de densidade de corrente dos picos de oxidação e redução, I_{oxi} e I_{red}, respectivamente, das medidas de VC para Au, auT, Cyst, TYR, BNC, auT + BNC e cyst + BNC, em dois ciclos.

	I _{oxi} [$\mu\text{A.cm}^{-2}$]		I _{red} [$\mu\text{A.cm}^{-2}$]	
	1º ciclo	2º ciclo	1º ciclo	2º ciclo
Au	35.0	32.4	-30.6	-29.9
auT	35.7	33.6	-29.6	-27.4
Cyst	53.0	48.4	-45.1	-45.3
TYR	50.2	45.4	-41.7	-43.7
BNC	55.4	50.8	-43.8	-46.5
auT + BNC	38.7	34.3	-19.1	-23.8
Cyst + BNC	66.6	61.2	-60.0	-59.2

O facto do valor da I_{oxi} diminuir do 1º para o 2º ciclo, mostra que ocorreu a reacção de oxidação do MC, entre a superfície do eléctrodo e a solução, conforme indica a reacção (1) (ver Capítulo 1.1.4) e o facto do valor correspondente de I_{red} aumentar do 1º para o 2º ciclo, mostra que o produto formado da oxidação, a *o*-quinona, foi reduzido electroquimicamente no eléctrodo, conforme indica a reacção (2) (ver Capítulo 1.1.4.), o valor da I_{oxi} vai diminuindo, não tão acentuadamente nem tão rapidamente, nos ciclos seguintes, enquanto houver substrato na solução, que permita a reacção de oxidação (ver Figura 34).

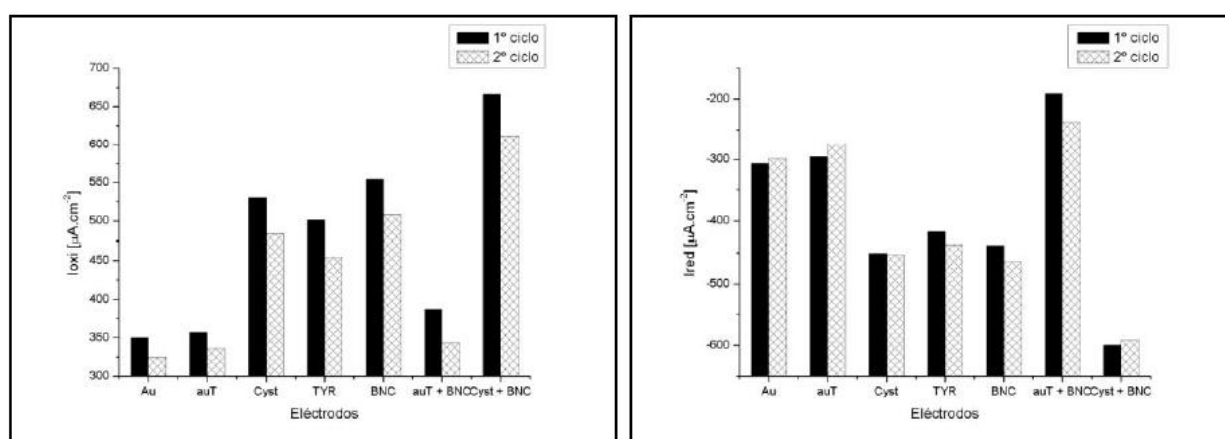


Figura 33 – Valores de densidade de corrente dos picos de oxidação e redução, I_{oxi} e I_{red}, respectivamente, das medidas de VC para Au, auT, Cyst, TYR, BNC, auT + BNC e cyst + BNC, em dois ciclos.

O tamanho e o tipo de eléctrodo têm bastante influência, quer na velocidade da reacção, quer na quantidade de substrato “consumido”. É possível observar pelos valores da Tabela 16, que entre o 1º e o 2º ciclo do eléctrodo de Cyst + BNC, o valor da diferença de I_{oxi} é o mais elevado, quando comparado com os restantes, o que indica uma oxidação de MC mais elevada, provavelmente devida à quantidade de bionanoconjugados presentes no eléctrodo, activa. O mesmo acontece na reacção de redução, relativamente aos mesmos eléctrodos. Um factor importante a ter em conta é a presença de AuNP. O sinal vai ser mais intenso, já que as AuNP promovem o aumento de sinal, na medida em que aumentam a superfície de contacto e a conductividade. Também, quando está presente enzima (sozinha ou em bionanoconjugado), observa-se um decréscimo da corrente, o que indica que há consumo do MC.

Tabela 16 – Valores das diferenças de corrente dos picos de oxidação e redução, I_{oxi} e I_{red}, respectivamente, das medidas de VC para auT, Cyst, TYR e BNC.

	$\Delta I_{oxi} [\mu A.cm^{-2}]$	$\Delta I_{red} [\mu A.cm^{-2}]$
Au	2.6	-0.7
auT	2.1	-2.2
Cyst	4.6	0.3
TYR	4.8	2.0
BNC	4.6	2.7
auT + BNC	4.4	4.7
Cyst + BNC	5.4	-0.8

Ao observar os declives da(s) curva(s) de oxidação da Figura 33, é possível dizer que quanto maior for a quantidade de TYR activa presente no eléctrodo, mais acentuado será o declive da(s) curva(s) de oxidação, o que indica que a velocidade da reacção é maior, visto que a TYR é uma oxireductase, isto é, catalisa as reacções redox (ver Capítulo 1.1.4).

É possível ver pelos declives e por ordem decrescente de velocidade de reacção, que a reacção entre o eléctrodo e o substrato é maior no eléctrodo de Cyst + BNC, seguido pelo

eléctrodo de TYR e finalmente pelo eléctrodo de BNC e Cyst, em simultâneo, logo, a camada intermédia de Cyst pode potenciar a reacção de oxidação (ver Figura 35).

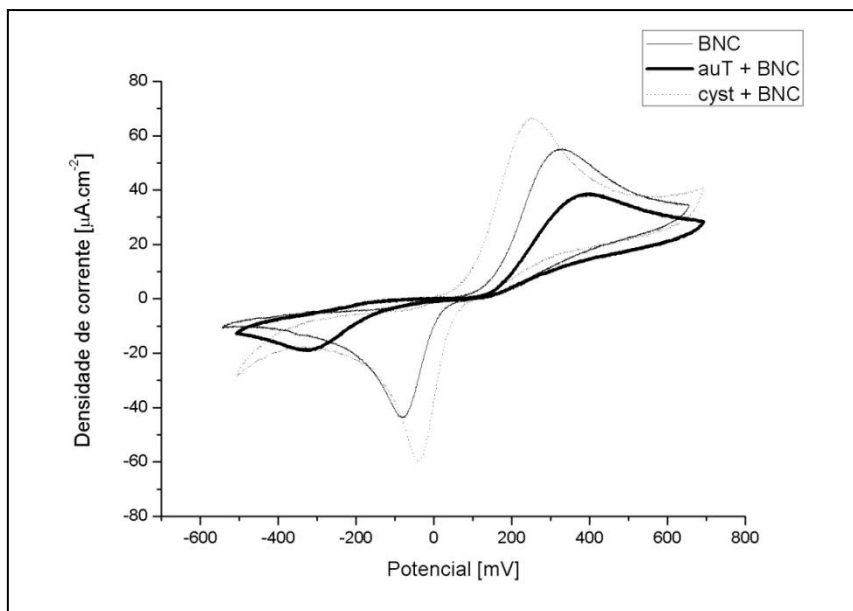


Figura 34 – Voltamogramas de diferentes camadas de bionanoconjugados depositadas sobre Au (1º ciclo de varrimento), numa solução de MC.

Comparando a velocidade de reacção entre o eléctrodo de Cyst e auT, é possível dizer que a oxidação de auT é mais lenta e com uma I_{oxi} mais baixa, provavelmente por causa do tamanho da cadeia. O auT [$H_2N(CH_2)_{10}COOH$] apresenta uma cadeia de 11 carbonos, enquanto que a Cyst [C_2H_7NS] tem apenas uma cadeia com 2 carbonos. A nível molecular, a Cyst é menor do que o auT, o que faz com que a passagem de electrões se faça de uma forma bastante mais rápida, aumentando a velocidade da reacção de oxidação (ver Figura 36).

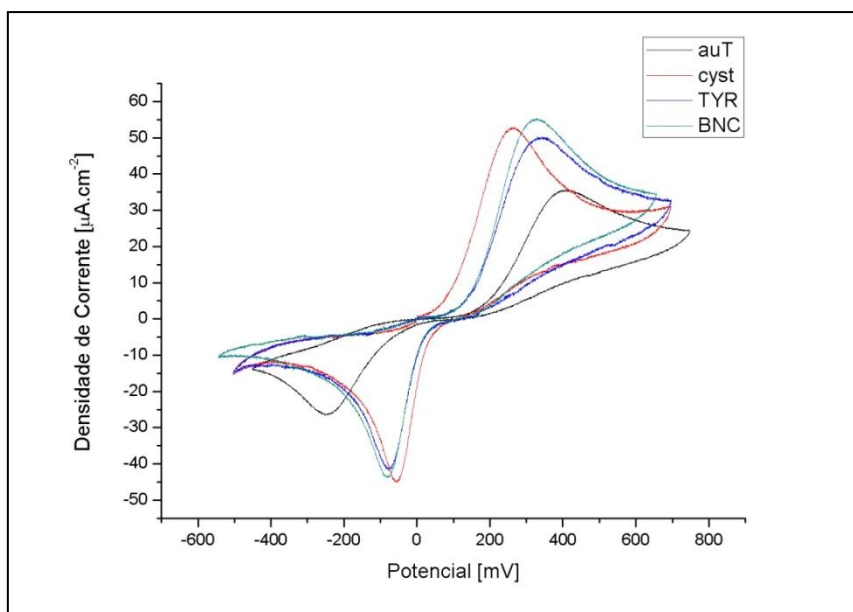


Figura 35 – Voltamogramas de diferentes camadas depositadas sobre Au (1º ciclo de varrimento), numa solução de MC.

Esta análise deve ser feita apenas de um modo qualitativo, na medida em que, para perceber pormenorizadamente a electroquímica subjacente às reacções presentes à superfície do eléctrodo, seria necessário estudar as mesmas, mas apenas em solução e, seguidamente, analisar o biossensor. Dessa forma, seria mais fácil identificar as trocas de electrões à superfície.

Analisando a electroquímica apenas das soluções, em primeiro lugar iria-se comparar uma solução de MC e uma solução de TYR e MC, seria de esperar um decréscimo de corrente, que seria indicativo da reacção de redução e de um consumo de MC em solução. Em segundo lugar, iria-se comparar uma solução de AuNP e MC e uma de bionanoconjugados e MC, seria de esperar decréscimo de corrente também, pela mesma razão (a presença de TYR no bionanoconjugado), apesar da presença das AuNP ir aumentar o sinal de corrente.

Capítulo 4

Conclusões

4. Conclusões

O objectivo principal deste trabalho foi estudar a imobilização de bionanoconjugados de AuNP CALNN e TYR sobre uma superfície de Au, de modo a obter depósitos de bionanoconjugados com actividade catalítica para utilização em biossensores para detecção de compostos fenólicos.

Foram preparados bionanoconjugados da enzima TYR e de AuNP esféricas e funcionalizadas com um péptido CALNN. O objectivo dessa funcionalização foi o de permitir uma maior e melhor biocompatibilidade entre a superfície de Au e de TYR, permitindo a sua imobilização eficaz, sem afectar a sua actividade enzimática.

Os valores obtidos de actividade para os *Layer-by-layer*, quando comparados com os valores de um depósito de bionanoconjugados, são inferiores. Os valores para um *Layer-by-layer* de 3 camadas é inferior ao de um de 5 camadas, por exemplo, contrastando com um depósito de apenas uma camada de bionanoconjugados, que apresenta um valor de actividade muito superior ao destes dois. Podemos assumir que o facto de depositarmos camadas alternadas de enzima e AuNP não vai melhorar significativamente a actividade do biossensor, no entanto, seriam necessários mais ensaios para afirmá-lo.

Os valores obtidos de actividade de um depósito de bionanoconjugados, sobre a superfície de Au do biossensor são ligeiramente superiores quando se introduziu uma SAM de Cyst, indicando que os bionanoconjugados ficaram imobilizados sobre a superfície de Au e obtiveram-se valores aceitáveis de actividade, logo, é favorável a funcionalização dos bionanoconjugados e a introdução de uma SAM intermédia poderá ser favorável.

Os resultados obtidos pelas análises de espessura média dos depósitos de bionanoconjugados, por Elipsometria Espectroscópica, por VC e por AFM, validam a hipótese de que uma

camada de bionanoconjugados depositada sobre uma superfície de Au oferece valores aceitáveis de actividade.

A determinação da actividade enzimática por colorimetria mostrou valores de actividade mais elevados, para uma camada de bionanoconjugados depositada directamente sobre uma superfície de Au, quando comparados com os valores de actividade obtidos após a introdução de uma camada intermédia, como a Cyst ou o auT.

Os valores obtidos para os mesmos biossensores, mas por VC, mostram que a introdução de uma camada intermédia pode provocar a passagem de electrões da solução para o eléctrodo, aumentando a resposta do biossensor. No entanto, o estudo feito por VC não foi um estudo exaustivo.

Os resultados obtidos permitiram a elaboração de um artigo [41] [42], não invalidando a necessidade de optimização e mais ensaios, por forma a melhorar os níveis de detecção do biossensor.

Capítulo 5

Trabalho futuro

5. Trabalho futuro

Um dos objectivos deste trabalho era o de construir um biossensor enzimático, que permitisse detectar a presença de compostos como mono e di-fenóis, geralmente presentes em pesticidas, em efluentes industriais ou domésticos.

Como trabalho futuro, deveria realizar-se a mesma bateria de ensaios, mas para uma amostra de água com presença de pesticida (poluída).

Outra possibilidade de trabalho futuro seria o de alterar a enzima usada. A TYR é uma enzima proveniente de diferentes fontes (cogumelos, frutas, plantas) e com valores de actividade diferentes, sendo um bom parâmetro de optimização. Alterando o pH da enzima, iria ser alterado o pI da mesma e, de acordo com a origem, esta iria apresentar valores de actividade diferentes.

Diferentes tipos de deposição de AuNP seriam também uma opção viável, visto que a imobilização dos bionanoconjugados à superfície é um passo fundamental para a construção e o desempenho do biossensor. Promover uma boa adesão é um requisito fundamental, sem afectar a actividade da TYR.

Poderão ser estudados diferentes tipos de funcionalização de AuNP, com péptidos com diferente composição e tamanho.

Capítulo 6

Referências bibliográficas

6. Referências Bibliográficas

- [1] *Preparation of a highly sensitive enzyme electrode using gold nanoparticles for measurement of pesticides at the ppt level.* **Gha-Young Kim, Joonmok Shim, Min-Su Kang and Seung-Hyeon Moon.** s.l. : Journal of Environmental Monitoring, 2008.
- [2] **Ferreira, Lucas Franco.** *Biosensor amperométrico à base de tirosinase na determinação de compostos orgânicos em amostras ambientais.* Uberlândia : Universidade Federal da Uberlândia - Instituto de Química, 2005.
- [3] **Nistor, C., et al.** a improved stability and altered selectivity of tyrosinase based graphite electrodes for detection of phenolic compounds. *Analytical Chimica Acta.* 1999, Vol. 387, 309-326.
- [4] **Yasuyuki Matoba, Takanori Kumagai, Aiko Yamamoto, Hironari Yoshitsu and Masanori Sugiyama.** Crystallographic Evidence That the Dinuclear Copper Center of Tyrosinase is flexible during catalysis. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY.* 2006, Vol. 281, 13.
- [5] <http://home.hiroshima-u.ac.jp/sugil/page014.html>. [Online]
- [6] **Hideo Notsu, Tetsu Tatsuma.** Simultaneous determination of phenolic compounds by using a dual enzyme electrodes system. *Journal of Electroanalytical Chemistry.* 2004, Vol. 566.
- [7] **Jean-Luc Besombes, Serge Cosnier, Pierre Labbé, Gilbert Reverdy.** A biosensor as warning device for the detection of cyanide, chlorophenols, atrazine and carbamate pesticides. *Analytica Chimica Acta.* 1995, Vol. 311.
- [8] **Nelson Durán, Maria A. Rosa, Alessandro D'Annibale, Liliana Gianfreda.** Applications of laccases and tyrosinases (phenoloxidases) immobilized on different supports: A review. *Enzyme and Microbial Technology.* 2002, Vol. 31.
- [9] **Fähnrich, K.** <http://www.karstenfaehnrich.de/default.htm>. [Online]
- [10] <http://www.imm.cnm.csic.es/RedBiosensores/index.html>. [Online]
- [11] *Introduction and Overview of Biosensors and Electrochemistry.* **Li, Prof. Chenzhong.** Florida : s.n. Biosensors and Nano-Bioelectronics.
- [12] **Simone Soares Rosatto, Renato Sanches Freire, Nelson Durán e Lauro Tatsuo Kubota.** Biosensores amperométricos para determinação de compostos fenólicos em amostras de interesse ambiental. 2001, Vol. 24, 1.
- [13] **Soares, Sergio Eduardo.** *Ácidos fenólicos como antioxidantes.* Campinas : Rev. Nutr., 2002.
- [14] **Cristina Gaspar, Eulália Pereira, Paula Gomes, Ricardo Franco, Hugo Águas, João Cortez.** *Nanocomposites of tyrosinase and gold nanoparticles for use as biosensors.* Caparica : s.n., 2009.
- [15] *Biosensor technologies.* s.l. : ELSEVIER, 2005.

- [16] **Águas, Hugo Manuel Brito.** Dispositivos de Estrutura Metal/Isolante/Semicondutor - MIS: Aplicação a Sensores de Posição de Silício Amorfo. *Dissertação para obtenção do grau de Doutor em Engenharia de Materiais*. Lisboa : FCT-UNL, 2005.
- [17] **Tavares, Pedro.** Métodos instrumentais de Análise I. *Acetatos das aulas*. Monte da Caparica : FCT-UNL.
- [18] *Nanotechnology* . **W. J. Parak, D. Gerion, T. Pellegrino, D. Zanchet, C. Micheel, S. C. Williams, R. Bordreau, M. A. Le Gros, C. A. Larabell and A. P. Alivisatos.** R15, Berkeley : s.n., 2003, Vol. 14.
- [19] **Cao, Guozhong.** *Nanostructures & Nanomaterials - Synthesis, Properties & Applications*. s.l. : Imperial College Press.
- [20] *Characterization and optimization of tyrosinase solid graphite electrodes for the detection of phenolic compounds*. **Narváez, A., et al.** 83-90, s.l. : Química Analítica, 1996, Vol. 15.
- [21] **Vastarella, Dr. Walter.** Enzyme Modified Electrodes in Amperometric Biosensors. *Tesi di Dottorato di Ricerca in Chimica dei Materiali Innovativi* . s.l. : Università Degli Studi di Bari - Facoltà di Scienze Matematiche Fisiche Naturali - Dipartimento di Chimica.
- [22] **Moraes, Marli Leite de.** Filmes nanoestruturados de materiais de interesse biológico: ênfase na interação com modelos de membrana e aplicações em biossensores. São Carlos : Universidade de São Paulo - Instituto de Química de São Carlos, 2008.
- [23] *Gold nanoparticle-based electrochemical biosensors*. **José M. Pingarrón, Paloma YÁñez-Sedeno, Araceli González-Cortés.** 5848-5866, Madrid : Electrochimica Acta, 2008, Vol. 53.
- [24] *INFLUÊNCIA DO pH NO PROCESSO DE IMOBILIZAÇÃO DE LIPASE EM FIBRA DA CASCA DE COCO VERDE*. **Pinheiro, A. D. T., Brígida, A. I. S. e Gonçalves, L. R. B.** Fortaleza : Universidade Federal do Ceará – Depto. de Engenharia Química, 2005. VI Congresso Brasileiro de Engenharia Química em Iniciação Científica.
- [25] **Villanova, Janaina Cecília Oliveira.** <http://www.authorstream.com/>. <http://www.authorstream.com/>. [Online] 2009. [Citação: 24 de January de 2009.] <http://www.authorstream.com/presentation/Pharmacotecnica-267788-biosensors-enzymatic-education-ppt-powerpoint/>.
- [26] **Simone Soares Rosatto, Renato Sanches Freire, Nelson Durán e Lauro Tatsuo Kubota.** BIOSSENSORES AMPEROMÉTRICOS PARA DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS EM AMOSTRAS DE INTERESSE AMBIENTAL. *Quim. Nova*. 2001, Vol. 24, 1.
- [27] **Kissinger, William P. King and Peter T.** Liquid Chromatography with Amperometric Reaction Detection Involving Electrogenerated Reagents: Applications with in-Situ Generated Bromine. *CLIN.CHEM.* 1980, Vol. 26, 10.
- [28] **Yamanaka, Paulo Roberto Brasil de Oliveira Marques e Hideko.** Biossensores baseados no processo de inibição enzimática. *Quim. Nova*. 2008, Vol. 31, 7.

- [29] **Raphaël Lévy, Nguyen T. K. Thanh, R. Christopher Doty, Irshad Hussain, Richard J. Nichols, David J. Schiffrin, Mathias Brust and David G. Fernig.** Rational and Combinatorial Design of Peptide Capping Ligands for Gold Nanoparticles. *J. AM. CHEM. SOC.* 2004, 126.
- [30] <http://www.nanosphere.us/>. <http://www.nanosphere.us/>. [Online] Nanosphere. [Citação: 26 de January de 2010.] http://www.nanosphere.us/Nanoparticles_4516.aspx.
- [31] **Lanteri, Prof. S.** <http://dipcia.unica.it/>. [Online] University of Genova, 2005. [Citação: 15 de May de 2009.] http://dipcia.unica.it/superf/PRIN_Campanella/researchsensors_2.html.
- [32] **Santos, Marta.** <http://naturlink.sapo.pt/article.aspx?menuid=6&cid=15563&bl=1&viewall=true>. <http://naturlink.sapo.pt/>. [Online] [Citação: 06 de March de 2010.] <http://naturlink.sapo.pt/ResourcesUser/Interessante/Nanotecnologias3.jpg>.
- [33] *Aplicação da técnica de Voltametria Cíclica na selecção do material de eléctrodo para o sistema mediador FeIII/TEA.* **M. de Fátima Esteves, M. T. Pessoa de Amorim.** Departamento de Engenharia Têxtil, Escola de Engenharia, Universidade do Minho, P-4800 Guimarães : s.n.
- [34] **color, Causes of.** <http://www.webexhibits.org/causesofcolor/9.html>. *webexhibits.org*. [Online] [Citação: 06 de 06 de 2010.] <http://www.webexhibits.org/causesofcolor/9.html>.
- [35] **Toma, Henrique E., Bonifácio, Leonardo da Silva e Anaissi, Fauze J.** From colors to inexistent colors: a reflection on electronic spectra and chromatic effects. *Química Nova*. 2005, Vol. 28, 5.
- [36] *Turkevich method for gold nanoparticle synthesis revisited.* **Kimling, J., et al.** 15700-15707, s.l. : Journal of Physical Chemistry B , 2006.
- [37] **Shaoming Yang, Yangmei Li, Xiuming Jiang, Zhichun Chen, Xianfu Lin.** Horseradish peroxidase biosensor based on layer-by-layer technique for the determination of phenolic compounds. *Sensors and Actuators B* . 2006, Vol. 114, 774–780.
- [38] *Optimized coverage of gold nanoparticles at tyrosinase electrode for measurement of a pesticide in various water samples.* **Gha-Young Kim, Joonmok Shim, Min-Su Kang, Seung-Hyeon Moon.** 141-147, Gwangju : Journal of Hazardous Materials, 2008, Vol. 156.
- [39] *The low-isoelectric point tyrosinase of Agaricus bisporus may be a glycoprotein .* **Yvonne A.M. Gerritsena, Chrystelle G.J. Chapelona and Harry J. Wichers.** 3, Wageningen : The International Journal of Plant Biochemistry, 1994, Vol. 35.
- [40] *Immunosensors: electrochemical sensing and other engineering approaches .* **Andrey L. Ghindilis, Plamen Atanasov, Michael Wilkins, Ebtisam Wilkins.** 1, Albuquerque : Biosensors and Bioelectronics, 1998, Vol. 13.
- [41] **Cortez J, Vorobieva E, Osório I, Soares L, Vale N, Pereira E, Gomes P, Franco R.** Bionanoconjugates of tyrosinase and peptide-derivatised gold nanoparticles for biosensing of phenolic compounds, *J Nanopart Res*, in print
- [42] **Cortez J, Gaspar C, Águas H, Soares L, Pereira E, Eaton P, Gomes P, Fortunato E, Franco R, Martins R.** Nanocomposites of tyrosinase and gold nanoparticles for use as biosensors, in submission

Capítulo 7

Anexos

7. Anexos

Anexo 1 – Medição da actividade enzimática

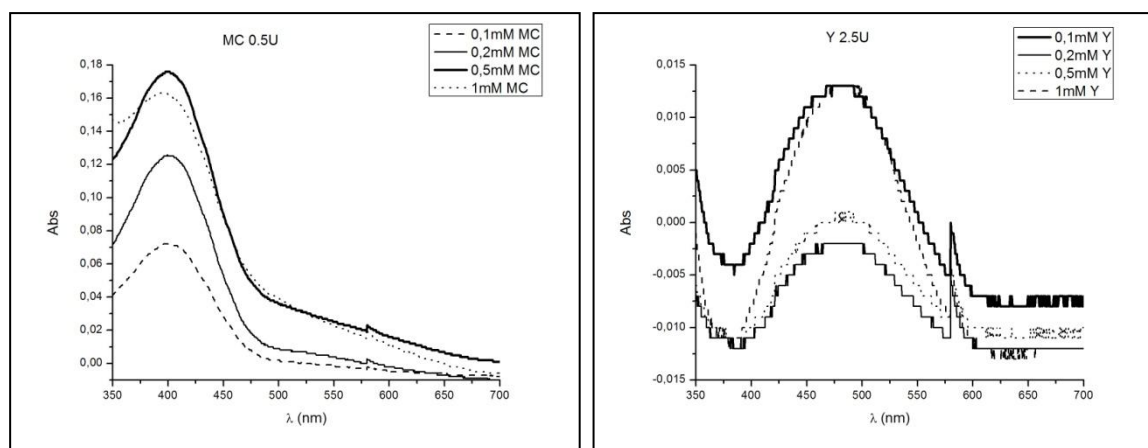


Figura 36 – Espectro de absorvância da actividade enzimática, na presença de MC como substrato (à esquerda) e na presença de Y como substrato (à direita).

Tabela 17 – Optimização dos limites de detecção da actividade enzimática, na presença de MC e Y como substrato, respectivamente, em cima e em baixo.

0.5U/ml	MC (μl)	TYR (μl)	Tampão (μl)	Água (μl)	Tempo (min)
0.1mM	40	16	200	744	5
0.2mM	80	16	200	704	5
0.5mM	200	16	200	584	5
1.0mM	400	16	200	384	5

2.5U/ml	Y (μl)	TYR (μl)	Tampão (μl)	Água (μl)	Tempo (min)
0.1mM	10	20	200	770	15
0.2mM	20	20	200	760	15
0.5mM	50	20	200	730	15
1.0mM	100	20	200	680	15

Anexo 2 – Influência do pH na agregação dos bionanoconjugados em solução

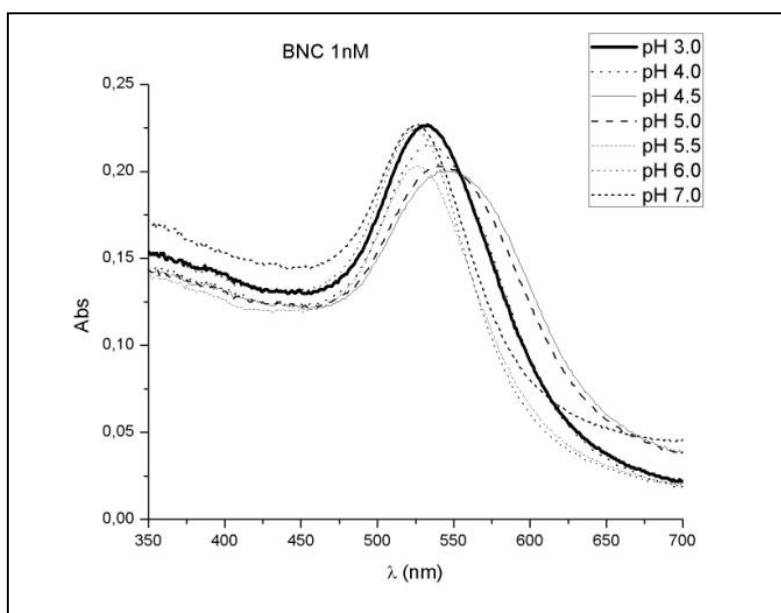


Figura 37 – Estudo da agregação dos bionanoconjugados (AuNP CALNN 1nM + TYR), através do pH.

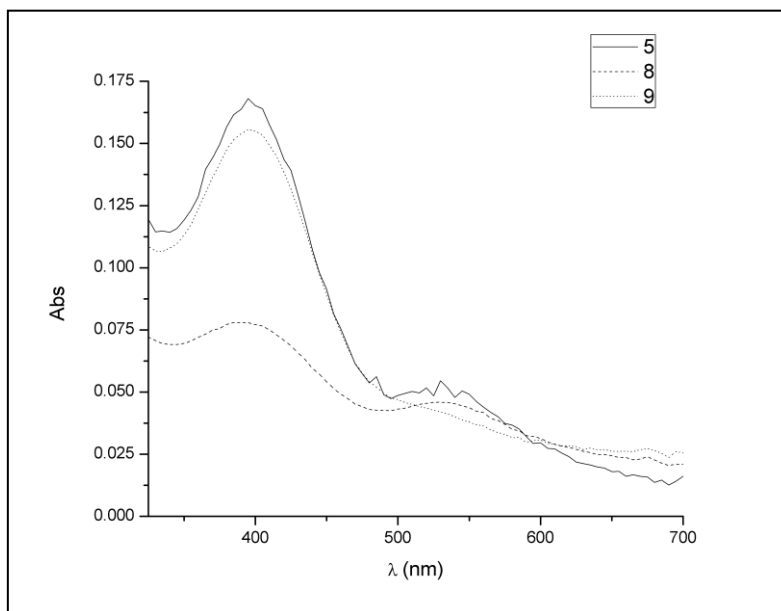


Figura 38 – Medidas de actividade de bionanoconjugados (AuNP CALNN 2nM), onde nos bionanoconjugados 8 e 9, foi depositada uma SAM de Cyst e BNC e no BNC 5, foi feito um depósito de BNC (que “secou” no frigorífico).

Anexo 3 – Ensaios de AFM

Tabela 18 – Imagens topográficas, por AFM, de diferentes depósitos efectuados sobre uma superfície de Au.

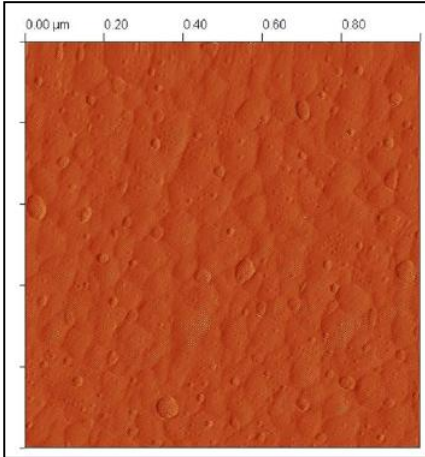
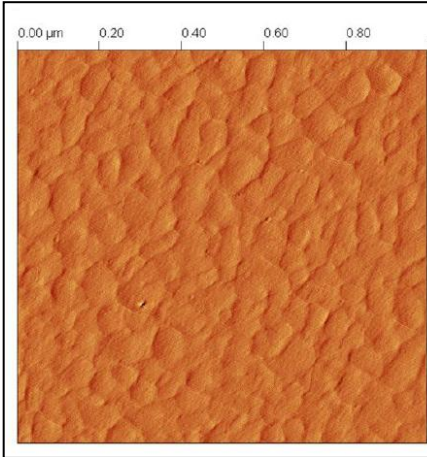
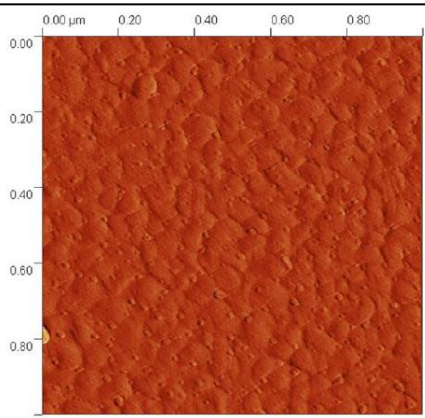
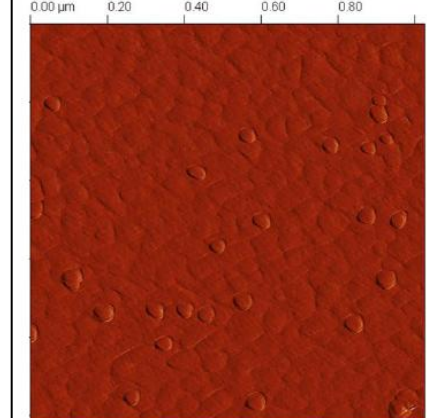
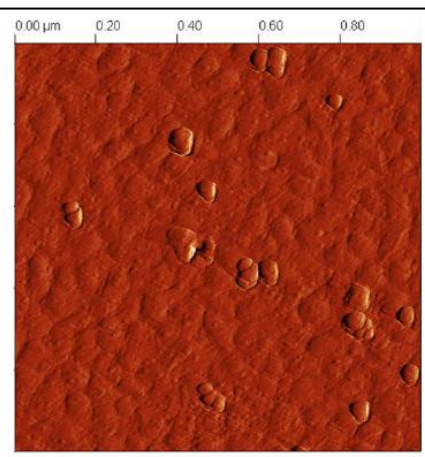
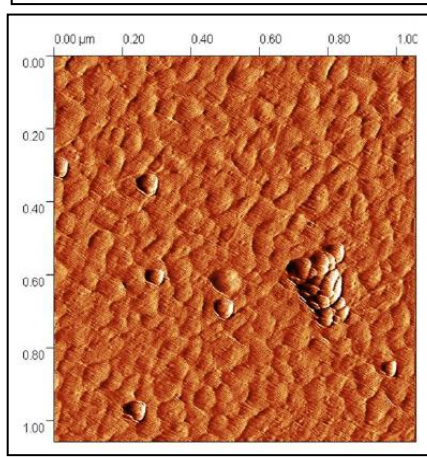
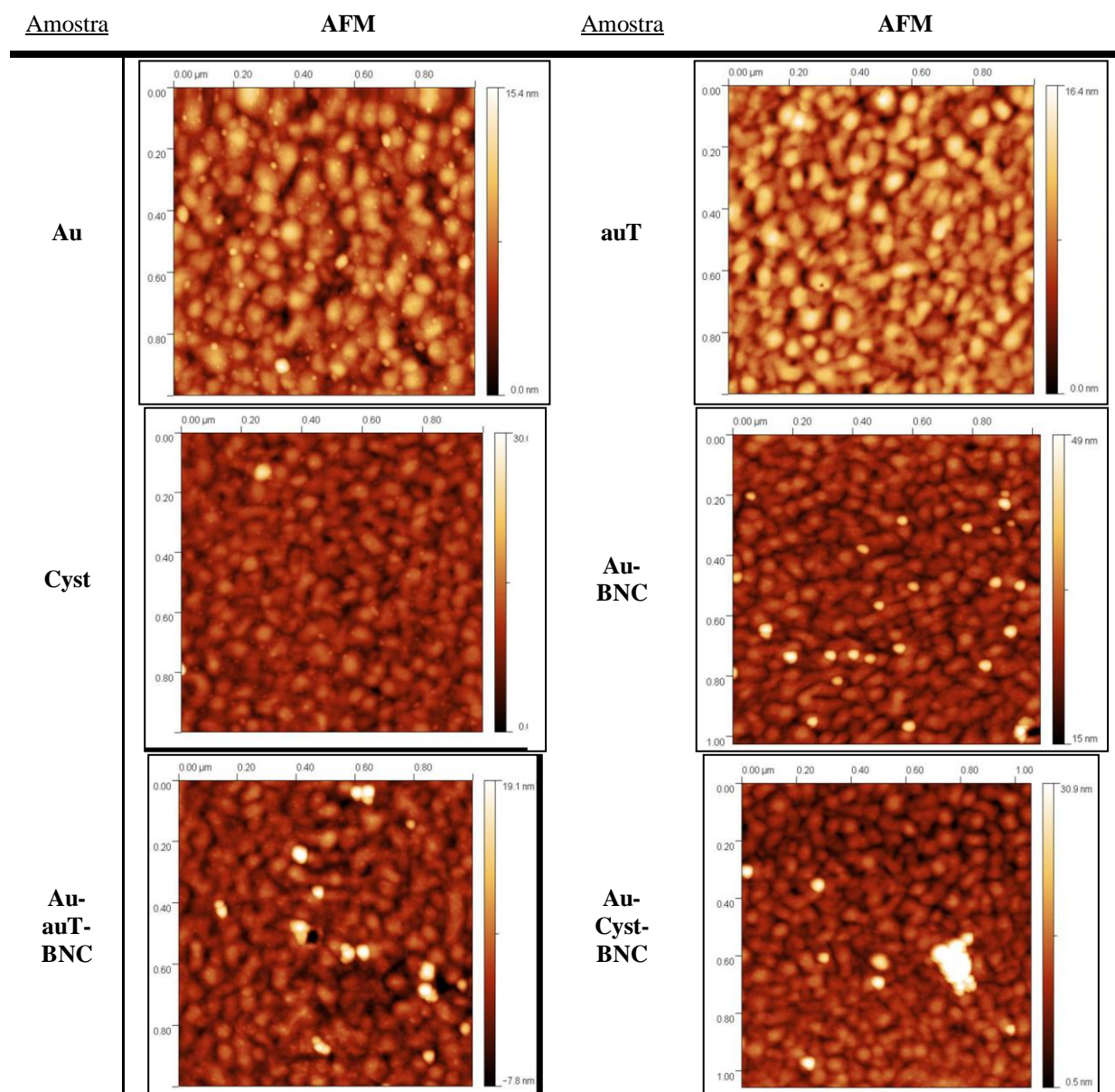
Amostra	AFM	Amostra	AFM
Au		auT	
Cyst		Au-BNC	
Au-auT-BNC		Au-Cyst-BNC	

Tabela 19 – Imagens de amplitude, por AFM, de diferentes depósitos efectuados sobre uma superfície de Au.



Anexo 4 – Ensaios de VC

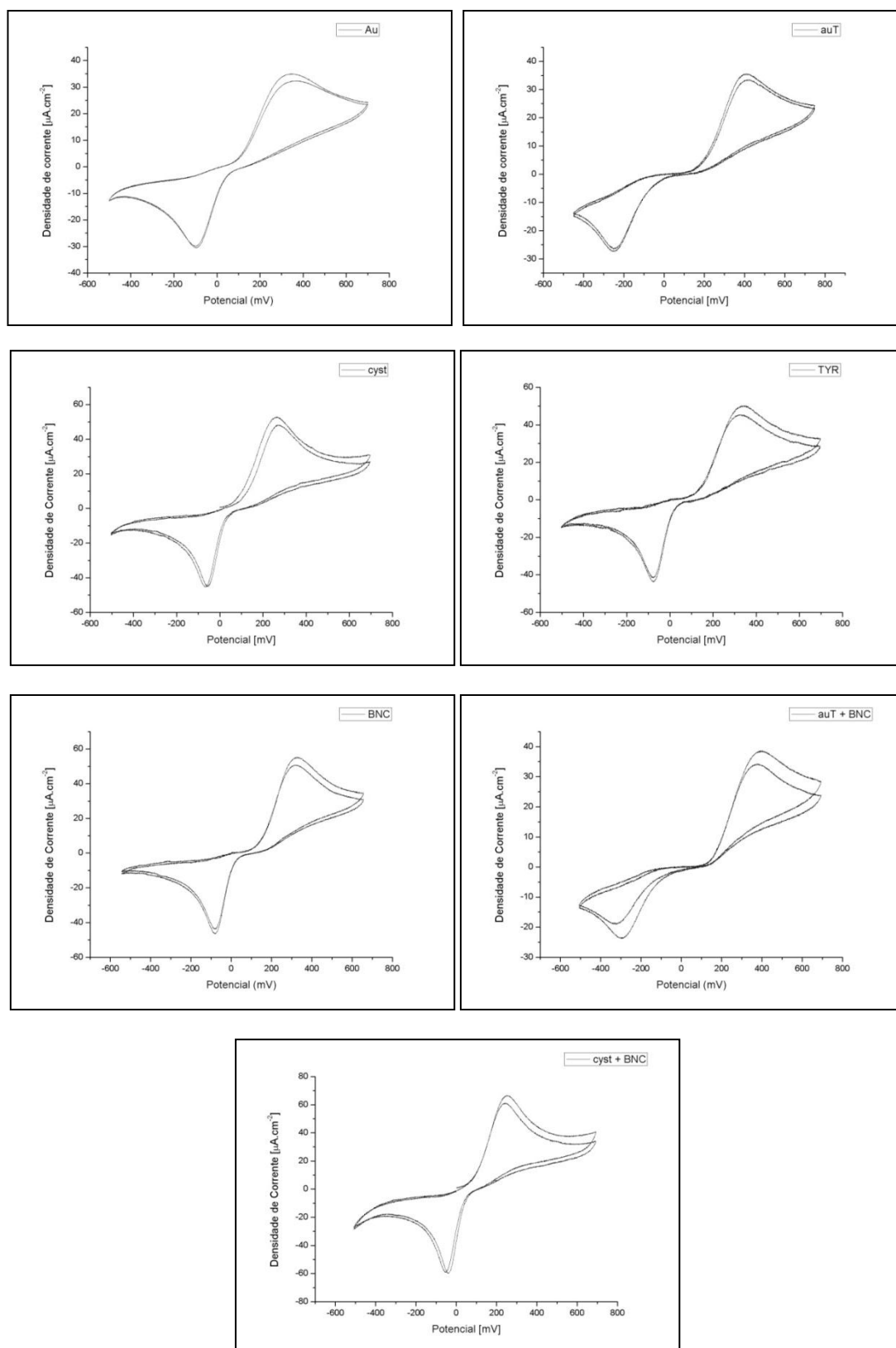


Figura 39 – Voltamogramas de cada uma das curvas de VC, para diferentes camadas de bionanoconjugados depositadas sobre Au, numa solução de MC (1º e 2º ciclos).